

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Cirugía



**VALOR PRONÓSTICO DE LOS MARCADORES
BIOLÓGICOS CEA, CA 12.5 P53 Y C-ERBB-2 EN
CARCINOMA NO MICRÓTICO DE PULMÓN**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Mauricio García Alonso

Bajo la dirección de los doctores
A. J. Torres García y M. Pollán Santamaría

Madrid, 2008

• **ISBN: 978-84-692-1070-3**

©Mauricio García Alonso, 2008

**VALOR PRONÓSTICO DE LOS
MARCADORES BIOLÓGICOS CEA, CA 12.5,
P53 Y C-ERBB-2 EN CARCINOMA NO
MICROCÍTICO DE PULMÓN.**

TESIS DOCTORAL

Mauricio García Alonso

MADRID, 2008

DIRECTORES:

Prof. A.J. Torres García

Dra. M. Pollán Santamaría

Quiero dedicar este trabajo a mi familia, en especial
a mi mujer, a mi hijo Javi y a mi hija recién nacida Pati.

Esta tesis doctoral no hubiera visto la luz sin la participación de muchas personas.

En primer lugar los directores, el Profesor Torres y la Doctora Pollán, que me han apoyado a dar forma a un proyecto de investigación comenzado hace varios años.

Al Profesor Balibrea que me inició en este trabajo científico.

Especial agradecimiento a los componentes de la Sección de Cirugía Torácica: Ana Gómez, Florentino Hernando Tranco, Joaquín Calatayud y Olga Rodríguez; así como a los residentes, Jarabo y Elena. No olvidar la participación de los Doctores Pac y Freixinet. Sin la colaboración de todos ellos no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Dar las gracias a mis compañeros del Servicio de Cirugía II, en especial a: Javier Cerdán, Fernando Esteban, Santiago Ochagavía, Pablo Talavera, Fernando Jiménez, Andrés Sánchez Pernaute, Luis Díez Valladares, Elia Pérez Aguirre, Gonzalo Sanz, Álvaro Robin, Rodrigo Sanz y Natividad Palencia.

Un especial reconocimiento a la Dra. Fernández, que ha conseguido mi interés en la ciencia estadística y cuya ayuda ha sido imprescindible para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1.- CARCINOMA BRONCOGÉNICO	2
EPIDEMIOLOGÍA	3
ETIOPATOGENIA	7
HISTOLOGÍA	16
A.- CARCINOMA EPIDERMOIDE	23
B.- CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS	25
C.- ADENOCARCINOMA	26
ADENOCA. BRONQUIOALVEOLAR	27
D.- CARCINOMA DE CÉLULAS GRANDES	28
E.- CARCINOMA ADENOESCAMO	30
F.- CARCINOMAS CON ELEMENTOS SARCOMATOIDES	30
G.- TUMOR CARCINOIDE	30
H.- CARCINOMAS DE TIPO SALIVAR	31
DIAGNÓSTICO	32
ESTUDIO DIAGNÓSTICO	32
1.-Historia clínica y exploración	33
2.- Técnicas de imagen	34
a) Radiografía convencional	34
b) Tomografía axial computarizada de baja radiación	36
c) Resonancia magnética nuclear	38
d) Tomografía por Emisión de Positrones	39

3.- Estudio del esputo	42
4.- Endoscopia respiratoria	45
5.-Punción percutánea	48
DIAGNÓSTICO DE EXTENSIÓN	49
A) EXTENSIÓN LOCAL	49
B) EXTENSIÓN METASTÁSICA	55
I.2.- BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN	75
MARCADORES TUMORALES	76
CONCEPTO	76
CLASIFICACIÓN	78
I.- MARCADORES DERIVADOS DEL TUMOR	81
MARCADORES DE SECRECIÓN	81
a.- ANTÍGENOS ONCOFETALES	81
b.- HORMONAS	84
c.- ENZIMAS	84
d.- PROTEÍNAS	86
e.- MUCINAS Y OTRAS GLICOPROTEÍNAS	89
II.- MARCADORES ASOCIADOS AL TUMOR	92
III.- OTROS MARCADORES	94
ONCOGENES	96
INTRODUCCIÓN	96
ALTERACIONES EN LA PATOCRONIA DEL CÁNCER	99

CLASIFICACIÓN	101
A.- Protooncogenes	101
1. Oncogenes ras	101
2. Oncogen myc	102
3. Oncogen c-erbB-1	103
4. Oncogen c-erbB-2/neu	104
5.- Oncogen BCL-2	105
6.- Oncogenes c-fos y c-jun	105
7.- Oncogen c-raf-1	106
B.- Genes supresores de tumor	106
1.- Gen Rb-1 y gen p16	108
2.- Gen p53	109
3.- Gen NM –23	114
C.- Genes reparadores	114
1.- Inestabilidad de microsatélites	114
2.- Pérdida de heterozigosidad	116
3.- Telomerasas	117
II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	120
III.- PACIENTES Y MÉTODOS	125
III.1.- PACIENTES	126
PERIODO Y LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	126
POBLACIÓN DEL ESTUDIO	127
1.- Muestra poblacional	127
2.- Características de los tumores y tratamiento	128

III.2.- MÉTODOS	132
METODOLOGÍA CLÍNICA	132
1.- Fase preoperatoria	132
2.- Fase operatoria	132
3.- Fase postoperatoria	133
METODOLOGÍA ANALÍTICA	135
METODOLOGÍA ESTADÍSTICA	141
METODOLOGÍA INFORMÁTICA	144
IV.- RESULTADOS	145
IV.1.- RESULTADOS GENERALES	146
IV.2.- INCIDENCIA DE MARCADORES TUMORALES	149
MARCADORES TUMORALES SÉRICOS	149
Resultados de las determinaciones de CEA	149
Resultados de las determinaciones de CA 12.5	149
MARCADORES TISULARES	149
Sobreexpresión de la proteína p-53	149
Sobreexpresión de la proteína p-185	149
IV.3.- RELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES Y LAS	
VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS	151
CEA	151
CA12.5	155
SOREEEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P53	159
SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEINA P185	162

IV.4.- SUPERVIVENCIA E INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD	165
A.-) SUPERVIVENCIA EN RELACION CON LAS DIFERENTES VARIABLES CLINICO-PATOLOGICAS Y MARCADORES	166
Variables clínico-patológicas	166
Marcadores séricos y titulares	176
B.-) INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD EN RELACION CON LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y LOS MARCADORES	182
Variables clínico-patológicas	182
Marcadores séricos y titulares	191
C.-) ANALISIS ESTRATIFICADO DE LA SUPERVIVENCIA	196
D.-) ANALISIS ESTRATIFICADO DEL INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD	200
IV.5.- ANALISIS MULTIVARIANTE	204
V.- DISCUSIÓN	211
VI.- CONCLUSIONES	232
VII.- BIBLIOGRAFÍA	236

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Radiografía de tórax: nódulo pulmonar en LSI.	35
Figura 2. Radiografía de tórax de paciente con carcinoma de pulmón en LID.	35
Figura 3. Tomografía axial computarizada de carcinoma de pulmón en LII.	37
Figura 4. Imagen de tomografía axial computarizada de un derrame pleural neoplásico en paciente diagnosticado de cáncer de pulmón.	38
Figura 5. Distintas proyecciones de una tomografía por emisión de positrones de un carcinoma de pulmón.	41
Figura 6. Imágenes de PET-TAC en paciente con neoplasia pulmonar.	41
Figura 7. Endoscopia bronquial: A.- Imagen con broncoscopia flexible. B.- Broncofibroscopia con fluorescencia.	47
Figura 8. Imagen de broncoscopia virtual.	47
Figura 9. Mapa ganglionar de Naruke. De: The Japan Lung Cancer Society. Classification of Lung Cancer, 1 st English Ed. Tokyo: Kanehara & Co., 2000.	61
Figura 10. Mapa ganglionar de Mountain-Dresler. De: Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. Chest 1997.	62
Figura 11. Distribución de la serie por género.	128
Figura 12. Distribución de la serie según el tipo histológico.	129
Figura 13. Distribución según el grado de diferenciación.	130
Figura 14. Estadificación TNM.	131
Figura 15. Supervivencia global. Curva de Kaplan-Meier.	147
Figura 16. Intervalo libre de enfermedad. Curva de Kaplan-Meier.	148
Figura 17. Incidencia de los marcadores tumorales.	150

Figura 18. Relación entre el estadio tumoral y los niveles de CEA.	154
Figura 19. Relación entre el estadio tumoral IIIA y los niveles de CEA.	154
Figura 20. Relación entre el grado de diferenciación y los niveles de CA 12.5.	157
Figura 21. Relación entre el estadio tumoral y los niveles de CA 12.5.	157
Figura 22. Relación entre el estadio tumoral IIIA y los niveles de CA 12.5.	158
Figura 23. Relación entre el estadio tumoral y la sobreexpresión de p53.	161
Figura 24. Relación entre el estadio tumoral y la sobreexpresión de p185.	164
Figura 25. Supervivencia según el tamaño tumoral.	169
Figura 26. Supervivencia según el tipo histológico.	170
Figura 27. Supervivencia según el estadio tumoral.	171
Figura 28. Supervivencia global en pacientes tratados con radioterapia adyuvante.	172
Figura 29. Supervivencia por estadios tumorales en pacientes tratados con radioterapia adyuvante.	173
Figura 30. Supervivencia global en pacientes tratados con quimioterapia adyuvante.	174
Figura 31. Supervivencia por estadios tumorales en pacientes tratados con quimioterapia adyuvante.	175
Figura 32. Supervivencia según los niveles séricos de CEA.	178
Figura 33. Supervivencia según los niveles séricos de CA 12.5.	179
Figura 34. Supervivencia según la sobreexpresión de p53.	180
Figura 35. Supervivencia según la sobreexpresión de p185.	181
Figura 36. Intervalo libre de enfermedad según el tipo histológico.	185
Figura 37. Intervalo libre de enfermedad según el estadio tumoral.	186
Figura 38. Intervalo libre de enfermedad global en pacientes tratados con radioterapia adyuvante.	187

Figura 39. Intervalo libre de enfermedad por estadios tumorales en pacientes tratados con radioterapia adyuvante.	188
Figura 40. Intervalo libre de enfermedad global en pacientes tratados con quimioterapia adyuvante.	189
Figura 41. Intervalo libre de enfermedad por estadios tumorales en pacientes tratados con quimioterapia adyuvante.	190
Figura 42. Intervalo libre de enfermedad según los niveles séricos de CEA.	192
Figura 43. Intervalo libre de enfermedad según los niveles séricos de CA 12.5.	193
Figura 44. Intervalo libre de enfermedad según la sobreexpresión de p53.	194
Figura 45. Intervalo libre de enfermedad según la sobreexpresión de p185.	195
Figura 46. Supervivencia de los tumores que no sobreexpresan p53 en relación con los niveles de p185.	207
Figura 47. Supervivencia de los tumores que sobreexpresan p53 en relación con los niveles de p185.	208

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Carcinogénesis del tabaco.	11
Tabla II. Casificación de Mountain et al. para la estadificación del carcinoma broncogénico (1997).	59
Tabla III. Tratamiento del cáncer de pulmón.	67
Tabla IV. Supervivencia por estadios clínicos y patológicos del carcinoma no microcítico de pulmón.	74
Tabla V. Clasificación de los marcadores tumorales por su naturaleza.	80
Tabla VI. Relación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de CEA.	153
Tabla VII. Relación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de CA 12.5.	156
Tabla VIII. Relación entre las variables clínico-patológicas y la sobreexpresión de p53.	160
Tabla IX. Relación entre las variables clínico-patológicas y la sobreexpresión de p185.	163
Tabla X. Porcentaje global de supervivencia en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses.	165
Tabla XI. Porcentaje global de intervalo libre de enfermedad en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses.	165
Tabla XII. Porcentaje global de supervivencia en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses para las distintas variables clínico-patológicas.	167

Tabla XIII. Porcentaje global de supervivencia en cáncer en pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses para los distintos marcadores tumorales.	177
Tabla XIV. Porcentaje global de intervalo libre de enfermedad en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses para las distintas variables clínico-patológicas.	183
Tabla XV. Porcentaje global de intervalo libre de enfermedad en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses para los distintos marcadores tumorales.	191
Tabla XVI. Porcentaje de supervivencia en cáncer en pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses. Análisis estratificado para el CA 12.5.	198
Tabla XVII. Porcentaje de intervalo libre de enfermedad en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses. Análisis estratificado para el CA 12.5.	201
Tabla XVIII. Porcentaje de intervalo libre de enfermedad en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses. Análisis estratificado para la sobreexpresión de p53.	202
Tabla XIX. Modelo de riesgos proporcionales de Cox en relación con la supervivencia.	205
Tabla XX. Modelo de riesgos proporcionales de Cox. Recidiva de la enfermedad.	209

I.- INTRODUCCIÓN

I.1.- CARCINOMA BRONCOGÉNICO

EPIDEMIOLOGÍA

Durante las últimas décadas se ha observado un aumento en la incidencia del cáncer. Este hecho se ha debido a varias causas, entre las que se encuentran: el aumento de la longevidad de la población, la mejoría en el control de otras patologías, la aplicación de nuevas tecnologías al diagnóstico, las políticas de atención sanitaria y los programas de cribado, que están facilitando el diagnóstico de algunas neoplasias. También hay que asociar este aumento de incidencia a otros factores: contaminación ambiental, sustancias empleadas en el ambiente laboral, consumo de alcohol y tabaco, hábitos nutricionales y falta de actividad física.

En el año 2002 (estudio GLOBOCAN) la estimación fue de 10,9 millones de casos de cáncer en todo el mundo, produciéndose 6,7 millones de fallecimientos. El cáncer más frecuente fue el de pulmón (1,35 millones) seguido del de mama (1,15 millones) y del cáncer colorrectal (1 millón). Globalmente, las tasas de mortalidad por cáncer son de 121,5 para los hombres y 95,1 para las mujeres; las tasas estandarizadas por 100.000 habitantes son de 137,7 y 92,1 respectivamente. El mayor número de fallecimientos por cáncer fue debido a los tumores pulmonares (1).

En Europa, los datos sobre incidencia y mortalidad, en el año 2006, fueron: 3.1 millones de casos de cáncer, con una mortalidad de 1,7 millones. El cáncer de mama fue el más frecuente (13,5%), seguido del colorrectal (12,9%) y del pulmonar (12,1%). Sin embargo, la mortalidad más alta se observó entre el cáncer de pulmón (19,7%), seguido del colorrectal, del de mama y del de estómago (2).

Durante el siglo XX la incidencia de cáncer de pulmón aumentó de forma muy importante, llegándose a mencionar el concepto de pandemia. El gran cambio tuvo lugar a partir de los años veinte, fecha en la que se empezó a observar un incremento progresivo del número de casos tanto en Europa como en EEUU. Desafortunadamente, el conocimiento de los primeros estudios de Doll y Hill en 1950 y 1952 sobre la relación del cáncer de pulmón con el consumo del tabaco no impidió que se consolidase el aumento de la población fumadora, de manera especial en los países desarrollados, y con ello el de los casos de cáncer de pulmón (3).

En cuanto a la edad ocurre con mayor frecuencia entre los 35-75 años, con un pico máximo entre los 56-66 años. Más del 80% aparecen en mayores de 50 años.

La relación hombre-mujer es de 3/1, aunque estamos asistiendo en los últimos años a un progresivo aumento de la incidencia en el sexo femenino, más notable en aquellos núcleos desarrollados donde el hábito de fumar fue adoptado más tempranamente por la mujer (4).

A nivel mundial (3) las tasas más bajas se encontraron en algunas regiones de la India, tanto en la población de hombres como en la de las mujeres, con cifras de 1,26 y 0,33 casos/100000, respectivamente. Las más altas se objetivaron en la población masculina de raza negra de algunos estados norteamericanos como Nueva Orleans, 110,8 casos/100000, ó Louisiana, 105,6 casos/100000; y en las mujeres maoríes de Nueva Zelanda con 72,9 casos/100000.

Epidemiología descriptiva en España:

Los mejores datos de incidencia en España se obtienen en los registros de cáncer que existen en algunas provincias ó autonomías. Así, en 1960 se puso en marcha el registro de

Zaragoza, en 1970 el de Navarra y a partir de 1990 los de Asturias, Tarragona, Murcia, País Vasco, Mallorca y Albacete. Los registros de cáncer establecidos envían sus datos periódicamente a la publicación *Cancer Incidence in Five Continents*, de la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (*Internacional Agency for Research on Cancer, IARC*). Los registros españoles, junto con otros europeos, han constituido la Red Europea de Registros del Cáncer (*European Network of Cancer Registries, ENCR*), desarrollando su actividad de acuerdo con unos criterios de calidad establecidos. Además han creado una base de datos común denominada EUROCIM que recoge información sobre la incidencia y mortalidad en la Unión Europea. En resumen, las principales fuentes de información son los servicios de Documentación Clínica y los de Anatomía Patológica procedentes tanto de centros públicos como privados, junto con los datos de mortalidad.

Los nueve registros de tumores españoles que enviaron sus datos de incidencia referidos al año 1990 a la base de datos EUROCIM (5) diagnosticaron en su ámbito geográfico un total de 24.969 neoplasias (14.623 en hombres y 10.346 en mujeres), de las cuales la cifra más elevada 3163 (12,6%), correspondía a los cánceres de pulmón. Concretando los datos por sexos se pudo apreciar que en los hombres este tumor fue diagnosticado en 2920 casos (20%), encontrándose en el primer lugar de frecuencia. En las mujeres el cáncer de pulmón, con 243 (2,3%), todavía se hallaba en el duodécimo puesto por su frecuencia, muy alejado del cáncer de mama, que con 2748 casos (26,5%) ocupaba el primer lugar.

Se ha comprobado en distintos trabajos que alrededor del 10% de los cánceres de pulmón incluidos tenían un diagnóstico de carácter clínico-radiológico exclusivamente. También que en los diagnosticados con citología ó histología predominan en España los tumores de estirpe escamosa en los hombres, seguidos en unas proporciones similares de

los carcinomas de células pequeñas y los adenocarcinomas, sin embargo, éstos últimos son los más frecuentes entre las mujeres. Es posible que en el futuro tal como ha ocurrido en otros lugares, se vaya produciendo un estancamiento del número de enfermos diagnosticados de carcinoma escamoso y un incremento progresivo de los afectos de adenocarcinomas.

En España se presentan 18.500 casos nuevos al año, siendo responsable de 17.308 fallecimientos. La razón hombre-mujer es de 11 (en Europa de 4,5), reflejando el retraso en la adquisición del hábito tabáquico y la menor exposición laboral (6). Las tasas más altas en hombres se encuentran en el suroeste (Sevilla y Cádiz) y en algunas provincias del norte (Asturias y Vizcaya); es llamativa la alta mortalidad en las mujeres en Gran Canarias. Con respecto a la evolución temporal de la mortalidad se demuestra que el ritmo de incremento se ralentiza desde 1988 y que en 1994 comienza a descender en un 0,35% anual. En mujeres, la mortalidad aumenta en España en un 2,4% desde 1990.

ETIOPATOGENIA

El cáncer es el resultado de una acumulación de alteraciones genéticas que afectan a diversos genes con distintas funciones celulares. El desarrollo del cáncer de pulmón se entiende hoy en día como una secuencia de múltiples factores, teniendo como base una predisposición genética sobre la que actúan distintos factores ambientales, entre los cuales existen carcinógenos conocidos como el tabaco, el asbesto, carcinógenos de la dieta, etc.

La carcinogénesis es un proceso complejo en la que están implicados al menos dos tipos de sustancias ó agentes: unas que inducen alteraciones genéticas ó iniciadoras (en la mayoría de los casos mutágenos como radiaciones y agentes químicos), y otras consideradas como promotoras tumorales, cuyo papel parece consistir en aumentar la proliferación celular (factores de crecimiento y hormonas).

Así en Estados Unidos, el consumo de tabaco es responsable del 90% de los casos de carcinoma broncogénico, la exposición a carcinógenos ambientales del 9 al 15%, el radón el 10% y la contaminación ambiental del 1 al 2%; la contribución de la dieta no está precisada pero puede ser un 10 y un 30%.

A continuación se describen los carcinógenos más conocidos:

1. TABACO:

El factor principal en la aparición del carcinoma broncogénico es la inhalación de contaminantes carcinogénicos, en especial humo de tabaco en huéspedes susceptibles (7), de hecho se considera que los productos tóxicos que contienen son los responsables en los países desarrollados de aproximadamente un 90% de estos tumores en la población masculina y un 80% de los que acontecen en las mujeres.

La estimación hecha por Peto et al. (8) de la variación en las tasas de mortalidad por cáncer de pulmón atribuida al consumo de tabaco pasa en las personas de 35 a 69 años de los países desarrollados desde 1965 a 1995 de 91 casos/100.000 a 137 casos/100.000 en los hombres, observándose un aumento más pronunciado en las mujeres: de 5 a 27 casos/100.000. Los mismos autores en proyecciones hechas para España estimaron que en 1995 la media de años perdidos debidos al hábito tabáquico era de 15 y para el grupo de 35 a 69 años aumentaba a 23 años de vida perdidos.

Hoy día disponemos de suficientes datos epidemiológicos procedente de estudios prospectivos del tipo casos-contróles y de cohortes (9,10,11) que demuestran este papel fundamental del tabaquismo activo en la génesis del cáncer de pulmón en seres humanos.

Se ha visto que la incidencia de cáncer broncogénico en fumadores respecto a no fumadores es de 4 a 10 veces mayor, y aumenta de 15 a 30 en fumadores empedernidos, en relación directa con el número de cigarrillos consumidos y con la edad de inicio del hábito así como con la edad del fumador.

Todos los tipos histológicos tienen una asociación significativa con el consumo de tabaco, aunque es más marcada en los carcinomas escamosos y de células pequeñas, que en los carcinomas de células grandes y los adenocarcinomas (12).

A pesar de la intensa investigación en este campo, todavía no se ha conseguido averiguar la sustancia específica contenida en el tabaco responsable de la actividad tumoral. En el humo del tabaco se han detectado cerca de 4000 sustancias diferentes, en las que hay que diferenciar dos grupos:

- Productos sólidos del llamado condensado del humo.
- Resto de los componentes del humo.

Entre los productos del condensado del humo tienen una gran importancia los hidrocarburos aromáticos policíclicos como Benzopireno y Dibenzoantraceno que se originan por la combustión incompleta del tabaco. Otros elementos a tener en cuenta son: Metilbenzopireno, Dibenzoacridina, Dibenzocarbazol, Betanaftilamina, Benzoflurantenno, Criseno y Benzofenantreno.

Los hechos que apoyan el papel carcinogénico del tabaco son:

- Pérdida de los cilios bronquiales e hiperplasia de la capa basal del epitelio, y el hallazgo de células atípicas en las secreciones histológicas del epitelio bronquial de fumadores y antiguos fumadores.
- Las lesiones cancerosas y precancerosas observadas en el epitelio bronquial del animal de experimentación al aplicársele los productos del condensado del humo.
- La importante relación existente entre el hábito de fumar y ciertos tipos histológicos de carcinoma broncogénico (epidermoide y de células pequeñas) que sólo representan el 1 % de los cánceres de pulmón en no fumadores.

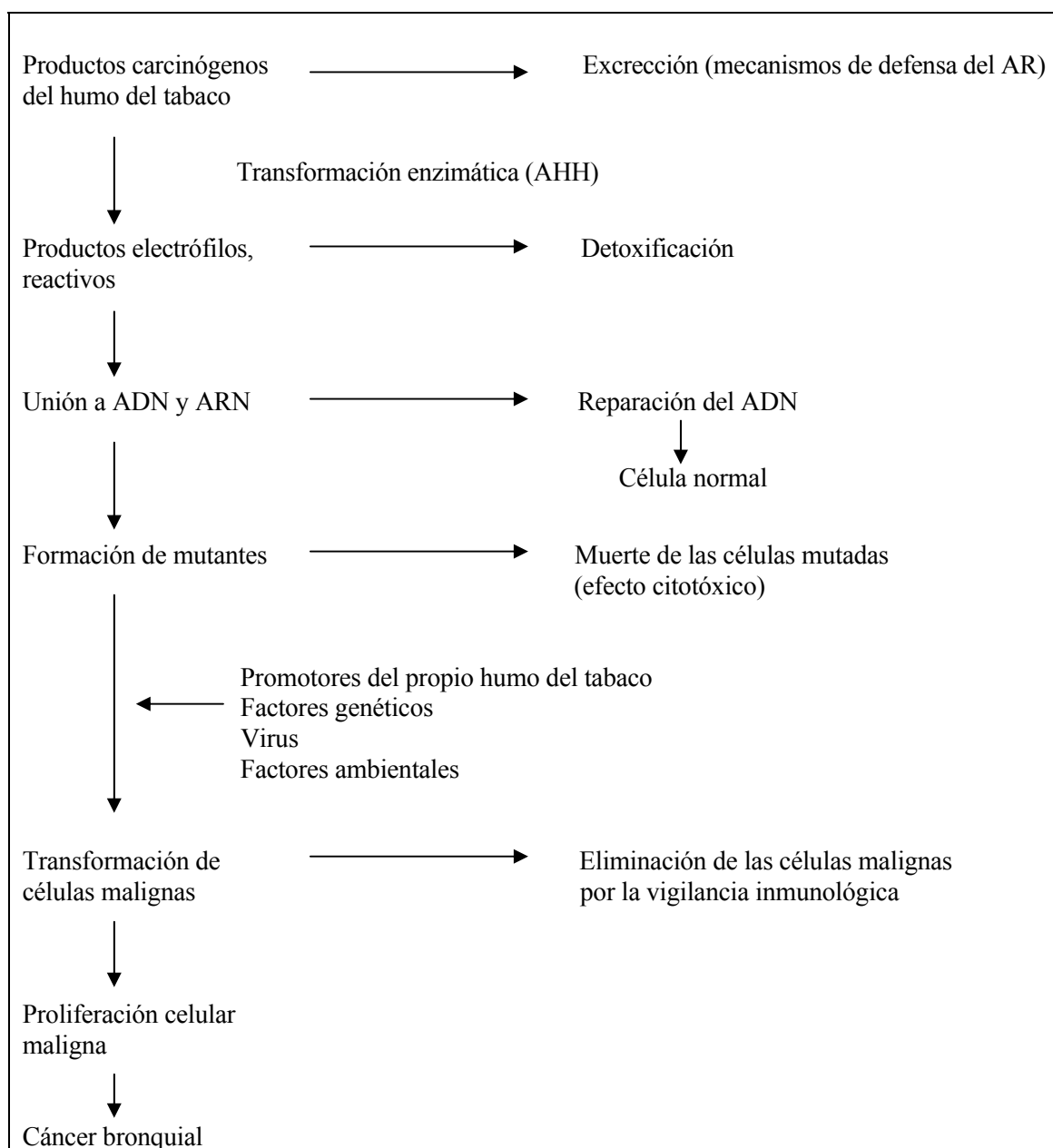
Debido a que muchos no fumadores desarrollan cáncer de pulmón, hay que pensar en la existencia de otros factores que contribuyen al desarrollo de esta neoplasia. Puede haber una interacción sinérgica entre factores hereditarios y tabaquismo, aunque todavía no se ha explicado la naturaleza de esta influencia familiar.

Los progresivos cambios displásicos en el epitelio bronquial de fumadores crónicos fueron bien documentados por Auerbach (13). Por otra parte Kotin (14) describe los cambios producidos por el tabaquismo como una progresión, desde un estadio hiperplásico inicial hacia metaplasia, posteriormente metaplasia con atipias y finalmente carcinoma "in situ" y carcinoma invasor (tabla I).

A juzgar por los resultados obtenidos en estudios recientes es muy poco probable que existan diferencias entre hombres y mujeres en cuanto al riesgo de padecer cáncer de pulmón. Aunque durante años se ha pensado que las mujeres tenían una menor predisposición, las diferencias pueden explicarse por las características del hábito tabáquico en este colectivo: el inicio ha sido más reciente, fuman menos cigarrillos, que además contienen cantidades inferiores en alquitrán/nicotina, y la inhalación es menos profunda que la referida por los hombres. Dichas características explican en buena medida el predominio en las mujeres de un tumor de localización más periférica, como es el adenocarcinoma, y el incremento del mismo que se está observando en los países más desarrollados, en los cuales el hábito tabáquico va adoptando un patrón semejante al que se ha descrito en la población femenina (3,15). De la misma manera parece que las posibles diferencias halladas en la incidencia del tumor entre diversas razas son consecuencia de los distintos patrones existentes en los hábitos de consumo de tabaco y no de factores biológicos particulares (15).

Con respecto al tabaquismo pasivo, a pesar de los esfuerzos realizados por la industria tabaquera para generar confusión y minimizar sus efectos (16), también podemos confirmar la existencia de estudios epidemiológicos indicativos de que dicha exposición involuntaria a humo de tabaco incrementa el riesgo de padecer un cáncer de pulmón.

Tabla I. Carcinogénesis del tabaco:



2. FACTORES OCUPACIONALES:

No resulta sencillo conocer de una manera precisa cuál es el papel que tienen los distintos carcinógenos potencialmente existentes en el medio laboral u ocupacional en la génesis del cáncer de pulmón. De hecho los estudios encaminados a valorar estos riesgos se enfrentan a posibles limitaciones, como la dificultad para diferenciar los efectos de los carcinógenos a los que están expuestos simultáneamente y para medir la intensidad y duración de la exposición a lo largo de la vida laboral, la combinación de riesgos cuando se añade el consumo de tabaco, el largo período que transcurre entre la exposición y la aparición del tumor y la escasez de información. Las cifras de riesgo atribuidas a la exposición a carcinógenos del medio ocupacional varían entre el 1% y el 40%, dependiendo sobre todo de las características de la población y el lugar geográfico elegidos para estudio (15).

En España se ha estimado que un 4% de la mortalidad por cánceres pueden ser consecuencia de diversas exposiciones laborales (17). Para el año 1991 se ha calculado que fallecieron 3011 hombres y 272 mujeres por esta causa.

En lo que se refiere a los tóxicos del medio laboral capaces de provocar estos tumores, la IARC incluye en su Grupo 1 (18) los siguientes relacionados con el pulmón: asbesto, arsénico, berilio, éter bisclorometílico y clorometílico, cadmio, cromo, gas mostaza, níquel, radón y cloruro de vinilo. Otros agentes químicos (dimetil sulfato, etc.) y metales (hierro, plomo, etc.) están encuadrados en el Grupo 2. Con respecto al cáncer de pulmón, los ambientes laborales/industriales en que pueden encontrarse estas sustancias tóxicas con mayor frecuencias son las fundiciones de metales, la construcción, astilleros, minería, agricultura, industrias químicas y del automóvil, entre otros (19).

En términos generales se piensa que el **asbesto** es el carcinógeno ocupacional más relevante. Para el pulmón es el que tiene también más importancia, habiéndose referido cifras de hasta el 20% de fallecimientos por cáncer de pulmón en algunas poblaciones expuestas (9,20). Existen trabajos que sugieren un efecto sinérgico entre tabaco y asbesto, circunstancia ésta que tiene una mayor trascendencia en países como España, donde tanto la prevalencia del tabaquismo como la exposición al asbesto han sido elevadas en las últimas décadas aunque afortunadamente tienden a reducirse (17).

La exposición a **radiaciones ionizantes**, constituye otro de los factores ocupacionales relacionados con el cáncer de pulmón. En los trabajadores de las minas de uranio se ha encontrado una alta incidencia debido a las radiaciones por la exposición al gas radón, procedente de la desintegración del $^{226}\text{radio}$. La estructura diana de las radiaciones ionizantes es el ADN. En estos trabajadores el riesgo es de hasta 20 veces, según algunas investigaciones, de padecer cáncer de pulmón (15). También que este riesgo se incrementa notablemente cuando coinciden en la misma persona exposición al radón y el consumo de tabaco (21).

3. RADÓN EN DOMICILIOS:

Además de los efectos derivados de la exposición al radón en el medio ocupacional es posible que este gas radiactivo, que se encuentra en distintas concentraciones en el interior de las viviendas procedentes de los materiales de construcción y sobre todo del suelo donde asientan, sea también causa de cáncer de pulmón.

En el año 1997 Lubin y Boice (22) publicaron los resultados de un metaanálisis realizado sobre los estudios del tipo casos y controles que, incluyendo un número superior a los 200 casos, contasen con medidas de radón domiciliarias durante un largo tiempo. Una

vez evaluados los 8 trabajos que cumplían estos requisitos, con un total de 4.263 pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón y 6.612 controles, se encontró que las personas expuestas en el domicilio a algunas concentraciones de radón de 4 pCi/L tenían un riesgo de desarrollar el tumor discretamente superior al de las personas no expuestas (RR: 1,14; IC: 1,0-1,3).

4. FACTORES DIETÉTICOS:

Existen factores dietéticos que pueden influir en el desarrollo de esta neoplasia; diversos estudios epidemiológicos han mostrado que las dietas altas en verduras y frutas protegen contra este tumor maligno, al igual que ocurre posiblemente con los carotenos. Del mismo modo, el riesgo de padecer la enfermedad parece superior cuando se consume frecuentemente alcohol y dietas con un contenido alto de grasas totales, saturadas y colesterol (23).

5. FACTORES GENÉTICOS:

Algunos autores (24) encontraron hace años un aumento en la incidencia del carcinoma broncogénico en grupos familiares sin relación alguna con los factores antes mencionados, sugiriendo a partir de ello que la susceptibilidad para desarrollar este tipo de neoplasias fuera heredada. Parece tratarse del sistema enzimático Arilhidrocarbono-Hidroxilasa (A.H.H.), ligado a la membrana celular y oxígeno dependiente, y que es el responsable de la transformación de determinados Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos débilmente carcinogénicos "per se" en formas metabólicas activas con participación en la carcinogénesis humana. Es necesario cierto número de lesiones moleculares genéticas y epigenéticas para transformar el epitelio bronquial normal en

un carcinoma broncogénico. Estas lesiones moleculares provocan, en última instancia, la anulación de la regulación de las claves celulares y de las vías de control de crecimiento (25). La biología molecular será descrita en capítulos posteriores.

6. OTROS FACTORES:

Diversas enfermedades pulmonares han sido asociadas con un incremento en el riesgo de padecer cáncer de pulmón. Esto ha ocurrido tanto en algunas que desembocan en la fibrosis pulmonar, secundaria a neumoconiosis, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis en el seno de enfermedades del colágeno e incluso la fibrosis local derivada de cicatrices como en otras de naturaleza obstructiva, fundamentalmente la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, que en sus fases más avanzadas puede llegar a alcanzar un exceso de riesgo próximo a 4. Parece posible que se hallen implicadas ciertas sustancias mitogénicas ó factores de crecimiento (15).

El 25 % de los pacientes tratados por un carcinoma de laringe desarrollan un carcinoma broncogénico durante los 10 años de seguimiento; el tipo histológico puede ser cualquiera. También se ha descrito la aparición de tumores de pulmón en enfermos con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana; suelen ser pacientes menores de 40 años, adictos a drogas por vía parenteral, con el tipo histológico preferentemente adenocarcinoma y con estadio avanzado en el momento del diagnóstico (26).

Otro factor potencialmente relacionado con la génesis del cáncer de pulmón es la polución atmosférica. De hecho, en el medio urbano podemos encontrar carcinógenos conocidos procedentes del humo de motores o industrias con mayor frecuencia que en zonas rurales.

HISTOLOGÍA

Parece evidente que el carcinoma broncogénico deriva de una célula madre pluripotencial de origen epitelial. Las células de reserva, las células mucosas, las células de Clara y los neumocitos tipo II son las posibles candidatas para desempeñar este papel. La exposición a carcinógenos ambientales inhalados, como el humo del tabaco, origina la aparición de cambios premalignos, hiperplasia y metaplasia, que darán lugar a la degeneración maligna. Estos cambios histológicos se suelen encontrar distribuidos de manera homogénea a lo largo de todo el epitelio respiratorio. La diferenciación escamosa que manifiestan los carcinomas de pulmón no es un patrón característico de la mucosa respiratoria, y su aparición hace pensar en una alteración de la diferenciación de la célula madre. Los cambios encontrados en las lesiones precursoras del carcinoma microcítico de pulmón son indistinguibles de los relacionados con el carcinoma epidermoide. En el adenocarcinoma no se han descrito los cambios celulares precursores de la neoplasia, pero en áreas adyacentes a los tumores se encuentran regiones con atipia e hiperplasia similares a las encontradas en relación con los otros tipos histológicos (27). Es más, dentro de un mismo tumor existen áreas de distinto aspecto morfológico; cuando se realizan más de 10 cortes histológicos de la tumoración, hasta un 45 % de los casos demuestran una marcada heterogeneidad y en el 10 % de los tumores se encuentran áreas de adenocarcinoma y zonas de carcinoma epidermoide (28).

La primera clasificación del carcinoma pulmonar es la debida a Marchesani (1924), el cual en el Innsbrucker Patologisch-anatomischen Institut subdividió los carcinomas pulmonares en 4 formas básicas. Esta clasificación permaneció en vigor durante más de dos décadas. A partir de este momento se producen dos variaciones importantes en la

situación anterior. Por una parte, el patólogo va a disponer de tumores menos evolucionados, sin tratamientos previos, aunque con persistencia en casos de la necrosis y de la infección por obstrucción bronquial, y con tejidos resecaados quirúrgicamente que se pueden someter a fijación adecuada y a muestreo histológico extenso, gracias a lo cual se dispone de una imagen histológica más fiel que la obtenida anteriormente. Así, se aprecia claramente la necesidad de establecer una correlación anatomoclínica a fin de conocer cuál es la historia natural de cada tipo histológico y sus posibilidades de tratamiento.

En este momento se recapitula todo el conocimiento previo acerca de clasificaciones; la debida a Kreyberg 1947 (29) subclasificó el carcinoma pulmonar en: adenocarcinoma, carcinoma escamoso, carcinoma mixto adenocarcinoma-carcinoma escamoso, carcinoma de células grandes, carcinoma de células pequeñas y carcinoma papilar de células alveolares. La diseñada en la Clínica Mayo por McDonald en 1951 subdivide el carcinoma pulmonar en 4 variantes básicas: escamoso, adenocarcinoma, anaplásico de células grandes y anaplásico de células pequeñas. Nash y Scout en 1958 (30) clasifican el carcinoma pulmonar en cuatro categorías mayores: carcinoma epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma indiferenciado de células pequeñas y de células grandes y formas mixtas. No es hasta 1958 (30) cuando a iniciativa de la OMS se crea un comité de expertos para la clasificación de las neoplasias pulmonares. La necesidad de sistematizar la clasificación para fines terapéuticos llevó al desarrollo de la clasificación del Veterans Administration Lung Cancer Chemotherapy Study Group (VALG) (1969), así como la del Working Party for Therapy of Lung Cancer (WP-L) (1973). Tras la publicación de la primera clasificación de la OMS, este organismo produjo otra nueva en 1981, también bajo la coordinación de Kreyberg (31), en la cual se introducen por primera vez referencias a lesiones preneoplásicas (displasia y carcinoma in situ), se reconoce una única variante

especial de carcinoma epidermoide (carcinoma epidermoide fusocelular), se mantiene como un grupo con cierta heterogeneidad morfológica el carcinoma anaplásico de células pequeñas y se simplifica el grupo de carcinoma anaplásico de células grandes identificando en él sólo dos variantes: el carcinoma de células claras y el carcinoma de células gigantes. Aparecen también las formas combinadas: el carcinoma adenoescamoso y las formas combinadas de carcinoma microcítico.

Clasificación de la OMS de 1999:

En 1999 vio la luz la nueva clasificación de neoplasias pleuropulmonares elaborada por la OMS (32). En ella se reelabora la clasificación anterior en 1981 con introducción de variaciones de cierta consideración. En primer lugar, y desde el punto de vista metodológico, en ella se hace referencia a la utilización de técnicas especiales no orientadas a la investigación, sino al diagnóstico rutinario, como son la inmunohistoquímica, la microscopía electrónica y la biología molecular. En segundo lugar, y desde el punto de vista puramente anatomoclínico, se avanza en la sistematización de las lesiones preinvasivas, se establecen criterios definidos para el diagnóstico diferencial entre los distintos tipos de tumores del espectro de neoplasias neuroendocrinas (carcinoide típico y atípico, tumorlet-hiperplasia de células neuroendocrinas), se sistematizan las formas de carcinomas de células grandes, combinadas y pleomórficas y se incluyen las entidades nuevas reconocidas en los últimos años.

Clasificación de la OMS de 2003:

Nacida de la Conferencia de Consenso de Lyon (33), en esta última clasificación se ahonda en el concepto de los tumores neuroendocrinos de pulmón ya iniciado en 1999. Los

tumores neuroendocrinos son un grupo con características morfológicas, moleculares e inmunohistoquímicas diferentes. El principal grupo morfológicamente identificable como tumores neuroendocrinos de pulmón lo componen: el carcinoma de células pequeñas (SCLC), el carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC), el carcinoide típico (TC) y el carcinoide atípico (AC) (34). Pacientes con carcinoide típico y atípico son más jóvenes que los que presentan SCLC y LCNEC. Además un criterio importante para diferenciarlos es el mayor número de mitosis (70-80 por 2 mm²) de los SCLC y LCNEC que los carcinoides (35). Clínicamente, entre un 20-40% de los pacientes con carcinoide típico ó atípico son no fumadores, en contraste con los otros dos grupos. Los carcinoides suelen desarrollarse en pacientes diagnosticados de síndromes neuroendocrinos múltiples, en especial en el MEN tipo I. Por último, existen diferencias genéticas entre SCLC y LCNEC con los carcinoides, siendo las alteraciones en p53 y LOH 3P más frecuentes en los primeros. Carcinomas no de células pequeñas con diferenciación neuroendocrina: existen algunos cánceres de pulmón que no expresan morfología neuroendocrina en el estudio microscópico convencional pero sí al estudio ultraestructural y/ó inmunohistoquímico. Así, entre un 10-20% de carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas y carcinomas de células grandes evidencian diferenciación neuroendocrina.

La Clasificación de la OMS de Lyon-2003 de las neoplasias pulmonares se desarrolla a continuación:

I.- TUMORES EPITELIALES:

I.1.- Lesiones epiteliales benignas:

a.- Papilomas:

- Papiloma de células escamosas.
- Papiloma glandular.
- Papiloma mixto de células escamosas y glandulares.

b.- Adenomas:

- Adenoma alveolar.
- Adenoma papilar.
- Adenoma tipo salivar.
- Cistoadenoma mucinoso.

I.2.- Lesiones epiteliales preinvasivas :

- a.- La metaplasia pavimentosa.
- b.- La hiperplasia adenomatosa atípica.

I.3.- Tumores epiteliales malignos:

- a.- Carcinoma escamoso ó epidermoide.
- b.- Carcinoma de células pequeñas.
- c.- Adenocarcinoma.

- d.- Carcinoma de células grandes.
- e.- Carcinoma adenoescamoso.
- f.- Carcinomas con elementos sarcomatoides.
- g.- Tumor carcinoide.
- h.- Carcinomas de tipo salivar.

II.-TUMORES LINFOPROLIFERATIVOS:

- II.1.- Linfoma marginal de células B tipo MALT.
- II.2.- Linfoma difuso de células B.
- II.3.- Granulomatosis linfomatoide.
- II.4.- Histiocitosis pulmonar de células de Langerhans.

III.- TUMORES MESENQUIMALES:

- III.1.- Hemangioendotelioma epitelial y angiosarcoma.
- III.2.- Blastoma pleuropulmonar.
- III.3.- Condroma pulmonar.
- III.4.- Tumor miofibroblástico peribronquial congénito.
- III.5.- Linfangiomatosis pulmonar difusa.
- III.6.- Tumor inflamatorio miofibroblástico.
- III.7.- Linfangioleiomiomatosis.
- III.8.- Sarcoma sinovial.
- III.9.-Sarcoma pulmonar arterial.
- III.10.- Sarcoma pulmonar venoso.

IV.- MISCELANEAS:

IV.1.-Hamartoma.

IV.2.- Hemangioma esclerosante.

IV.3.- Tumor de células claras.

IV.4.- Tumores de células germinales.

IV.5.- Timoma intrapulmonar.

IV.6.- Melanomas.

V.- METÁSTASIS:

TUMORES EPITELIALES MALIGNOS:

Los cuatro tipos principales: epidermoide, adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y carcinoma de células pequeñas constituyen el 90% de todos los tumores, y pertenecen a la categoría de carcinomas primarios epiteliales.

El cáncer de pulmón es un tumor notablemente heterogéneo que muestra diversas combinaciones de tipos histológicos y células en distinto estado de diferenciación. Incluso en una sola célula tumoral se pueden observar combinaciones de varias características de diferenciación, por ello es difícil apreciar esta heterogeneidad en muestras de biopsias y es necesario el procesamiento de múltiples muestras procedentes de la resección quirúrgica para llegar al diagnóstico definitivo según el tipo histológico predominante.

A.- CARCINOMA EPIDERMOIDE Ó ESCAMOSO:

Constituye aproximadamente el 20-35% de los cánceres de pulmón (36). Desde el punto de vista macroscópico suele ser central (60-80%), en relación con bronquios de gran calibre, de aspecto blanquecino ó gris y generalmente duro por la gran reacción desmoplásica que provoca (37). Puede encontrarse cavitado, generalmente cuando es de gran tamaño, debido a necrosis central.

Su diagnóstico anatomopatológico requiere la evidencia de diferenciación escamosa, esto es, de estratificación y puentes intercelulares, con áreas de queratinización. Según la presencia más ó menos abundante de estos factores se habla de carcinoma epidermoide bien, moderadamente ó poco diferenciado.

En todos los casos para hablar de carcinoma epidermoide se han de evidenciar unos hechos aún en las formas más indiferenciadas:

- Presencia de tonofilamentos
- Desmosomas
- Espacios claros intercelulares
- Gránulos de queratohialina
- Zonas granulares elentrodensas paramitocondriales

El carcinoma bien y moderadamente diferenciado presenta generalmente crecimiento exofítico intraluminal. Este crecimiento suele ser lento y las metástasis se encuentran en primer lugar en los ganglios linfáticos regionales, por tanto es el que más se beneficia del tratamiento quirúrgico en sus fases iniciales. El carcinoma epidermoide poco diferenciado tiene un crecimiento más rápido. Las metástasis a distancia son menos frecuentes que en los adenocarcinomas. La recidiva

locorregional tras el tratamiento quirúrgico es más común que en otros tipos histológicos.

Es importante el reconocimiento de subvariantes de carcinoma epidermoide, unas por su aspecto endoscópico, otras por su diagnóstico diferencial y otras finalmente por su pronóstico (38):

- Las primeras de ellas son las variantes papilares, en las cuales el tumor crece como una única masa de aspecto papilamotoso ó como un crecimiento superficial de estructuras papilares múltiples que tapizan parte de la superficie del bronquio (39,40).
- El carcinoma epidermoide de células claras, compuesto por células de citoplasma óptimamente vacío ocupado por glucógeno, debe ser diferenciado de otras neoplasias con células claras en el pulmón como el adenocarcinoma de células claras y los carcinomas renales metastásicos, especialmente cuando las metástasis son endobronquiales (41).
- La variante conocida como carcinoma epidermoide de células pequeñas tiene importancia, especialmente en su diagnóstico en material endoscópico, ya que el material biópsico con artefacto por aplastamiento puede confundirse con un carcinoma microcítico. La negatividad de las técnicas inmunohistoquímicas para la demostración de marcadores neuroendocrinos, permiten la identificación de esta variedad que no muestra gránulos de neurosecreción en estudio ultraestructural (42).

- El carcinoma epidermoide puede presentar áreas de carcinoma basaloide, el cual esta compuesto por elementos de ambas morfologías. Este tipo tumoral se asocia con un peor pronóstico (43).

B.- CARCINOMA DE CÉLULAS PEQUEÑAS:

Se define como un tumor compuesto por células pequeñas con escaso citoplasma, límites celulares mal definidos, cromatina finamente granular y nucleolos inconspicuos ó invisibles. Las células son redondeadas, ovals ó fusiformes con moldeamiento nuclear (44). La tasa mitótica es alta.

Estos tumores muestran gránulos de neurosecreción en su citoplasma, generalmente de menor tamaño y más escasos que los hallados en otros tumores ó hiperplasias de sistema neuroendocrino pulmonar, así como una reactividad inmunohistoquímica para diferentes péptidos y aminos. En su diagnóstico es útil el marcaje positivo focal para cromogranina A y sinaptofisina, que no se demuestra sin embargo en 1 de cada 4 pacientes en el material de biopsia endoscópica, así como la negatividad genérica de marcadores linfocitarios.

La variación más importante de la nueva clasificación es la simplificación del grupo del carcinoma microcítico a dos componentes: El carcinoma de células pequeñas convencional y el carcinoma microcítico combinado.

➤ Carcinoma de células pequeñas combinado:

En este grupo tumoral se incluyen todos aquellos tumores en los que junto a un componente microcítico se observa otro no microcítico tipo adenocarcinoma, carcinoma escamoso, carcinoma fusocelular ó gigantocelular.

C.- ADENOCARCINOMA:

Es el tipo de cáncer de pulmón más frecuente en no fumadores (45) y constituye entre el 30 al 50% de los cánceres de pulmón. Suele ser de localización periférica, pudiendo provocar retracción y engrosamiento pleural. Según su contenido en mucina la consistencia varía desde blanda hasta de aspecto mucoide. Puede presentar áreas de necrosis aunque la cavitación es rara. Su tendencia a la diseminación linfática es alta incluso en tumores pequeños. Sagawa y col. describieron una incidencia de metástasis linfáticas mediastínicas del 20% frente al 10% en los tumores escamosos (46). La diseminación a distancia se observa con más frecuencia que en los escamosos, los órganos más afectados son: cerebro, huesos, glándula suprarrenal e hígado.

Se define como aquel carcinoma que muestra diferenciación glandular exocrina demostrable mediante diferenciación acinar, papilar, bronquioalveolar ó la producción de moco tanto extra como intracelular. Se incluyen también en este grupo tumores de crecimiento sólido, sin producción de acinis ó papilares, en los que se puede demostrar producción de mucina.

El adenocarcinoma puede subclasificarse atendiéndose a su patrón de crecimiento y, en el caso del bronquioalveolar, a la morfología celular y a la presencia de mucosecrección. Lo más frecuente, en especial en tumores de gran tamaño (>2 cm.) es encontrar una mezcla de patrones histológicos con predominio de uno de ellos en cada caso. Así, es más frecuente que en las porciones centrales de los tumores grandes el patrón histológico sea el de carcinoma acinar ó sólido en tanto que en las porciones más periféricas, en el margen de invasión del tumor el

crecimiento tiende a ser de tipo papilar ó bronquioalveolar. Los tumores más pequeños tienden a mostrar una morfología casi exclusivamente bronquioalveolar.

Variedades:

➤ **Adenocarcinoma de tipo mixto:**

Se incluyen aquellas formas de adenocarcinomas en las que existe una mezcla de los patrones anteriores. Es la variedad más frecuente, representando un 80% de los adenocarcinomas resecaos (47).

➤ **Adenocarcinoma acinar:**

Se define como aquel que crece formando acinis y/ó túbulos con luces centrales, ocupadas ó no por moco.

➤ **Adenocarcinoma papilar:**

Es aquel que crece formando papilas que reemplazan la arquitectura normal del pulmón.

➤ **Adenocarcinoma bronquioalveolar:**

Este grupo queda restringido a aquellos tumores con un crecimiento bronquioalveolar puro, en la superficie de los alvéolos y sin evidencia de invasión vascular, estromal ó linfática.

Existen dos formas:

No mucosecretoras: Constituyen una proporción importante de los adenocarcinomas periféricos que aparecen en inmediato contacto con la pleura a la cual invaginan

Mucosecretoras: La inclusión en este grupo viene dada por dos criterios básicos, la morfología celular y su patrón de crecimiento no invasivo; y

por un criterio menor, su aspecto macroscópico y su tendencia a producir implantes en el pulmón por vía aerógena.

➤ **Carcinoma sólido con producción de mucina:**

Se define como un carcinoma de morfología no microcítica, en el que no se observa la formación de acinis, papilas ó túbulos, creciendo como cordones sólidos en los que de forma ocasional se observan vacuolas intracelulares de moco. Subtipos: se consideran el adenocarcinoma bien diferenciado tipo fetal, el mucosecretor de tipo coloide, al cistoadenocarcinoma de tipo mucinoso, el carcinoma de células en anillo de sello y el adenocarcinoma de células claras.

D.- CARCINOMA DE CÉLULAS GRANDES:

Constituyen aproximadamente el 9% de las neoplasias malignas pulmonares (48). Se definen típicamente por exclusión como carcinomas no microcíticos sin diferenciación escamosa ó glandular. Cuando estos tumores son sometidos a estudio ultraestructural ó inmunohistoquímico se comprueba que aproximadamente la mitad muestran signos de maduración escamosa y la otra mitad glandular. Parece razonable admitir que los auténticos carcinomas de células grandes corresponderían a formas de indiferenciación extrema de carcinomas epidermoides ó adenocarcinomas. Su frecuencia es muy reducida en series de piezas quirúrgicas estudiadas.

Variedades:

➤ **Carcinoma neuroendocrino de células grandes:**

Compuesto por elementos poligonales de núcleos abiertos con nucleolo generalmente prominente que se ordenan en un patrón organoide, sugerentes de maduración endocrina. El 50% expresan TTF-1. (49).

➤ **Carcinoma basaloide puro:**

Es un tumor integrado por elementos de aspecto basal con núcleos moderadamente hipercromáticos de nucleolo ausente ó poco llamativo y con tasa de mitosis alta. Su pronóstico es muy pobre.

➤ **Carcinoma linfoepitelioma-like:**

Es muy poco frecuente. Muestra una morfología en microscopía de luz muy similar a la del carcinoma nasofaríngeo tipo linfoepitelioma. Parece ser más frecuente en occidente; en oriente se asocia al virus Epstein Barr.

➤ **Carcinoma de células claras:**

Corresponde a aquellas neoplasias íntegramente formadas por células claras de aspecto vegetal parecidas a las del carcinoma renal metastático y sin signos de maduración escamosa ó glandular.

➤ **Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoide:**

Las células muestran una positividad simultánea para vimentina y queratina, así como a veces gránulos de neurosecrección (50).

E.- CARCINOMA ADENOESCAMO:

Son aquellas neoplasias en las que se demuestran dos componentes bien definidos, glandular y escamoso, que comprenden al menos el 10% de la masa tumoral. Frecuencia del 0,4-4%.

F.- CARCINOMAS CON ELEMENTOS SARCOMATOIDES:

Son definidos como carcinomas de células no pequeñas de baja madurez, que contienen un componente de elementos sarcomatosos ó sarcomatoides de conformación fusiforme, gigantecelular ó una combinación de ambas (51). Infrecuente: 0,3-1,3%.

Variedades:

- Carcinoma pleomórfico.
- Carcinoma fusocelular.
- Carcinoma de células grandes.
- Carcinosarcoma.
- Blastoma pulmonar.

G.- TUMOR CARCINOIDE:

Es un tumor compuesto por células uniformes de citoplasma granular moderadamente eosinófilo y núcleos con un patrón cromático fino, con ocasionales nucleolos que son más frecuentes en las formas atípicas. Se definen dos formas, la típica y la atípica, con peor pronóstico.

H.- CARCINOMAS DE TIPO SALIVAR:

Los dos más frecuentes en el tracto respiratorio inferior son el carcinoma mucoepidermoide y el carcinoma adenoide quístico ó cilindroma. El primero muestra una morfología similar a su homólogo salivar, apareciendo compuesto por una triple población de células escafoides, intermedias y mucosecretoras de conformación globular. El adenoide quístico aparece con máxima frecuencia en la tráquea y bronquios más proximales, lugares en los que la densidad de glándulas submucosas es mayor; presenta una acusada tendencia a la diseminación perineural y extraparietal. Existe un tercer tipo, el carcinoma epitelial-mioepitelial, compuesto por células mioepiteliales y fusiformes; no parece relacionarse con el tabaco y su localización suele ser endobronquial.

DIAGNÓSTICO

ESTUDIO DIAGNÓSTICO:

Con la metodología actual aplicada habitualmente por la aparición de sintomatología, se diagnostican en condiciones de abordar tratamiento quirúrgico menos de un 25% de los pacientes.

Dado que las terapias actuales distintas a la cirugía no parecen mejorar sustancialmente los resultados, es preciso elaborar programas de detección precoz antes de la aparición de síntomas, con lo cual se aumentan las posibilidades de éxito de resección.

La actual situación negativista en cuanto al diagnóstico precoz del cáncer de pulmón se halla influenciada por las conclusiones de cuatro estudios randomizados realizados en la Clínica Mayo, John Hopkins University y Sloan Kettering Cancer Center en EEUU, y un cuarto en Checoslovaquia (52,53); en los cuales no se demostraba mayor supervivencia a largo plazo en los grupos de estudio con relación a los controles. Sin embargo, existen muchos datos esperanzadores en sus resultados y errores en la metodología, que obligan a replantearse sus conclusiones y su valor clínico.

Las personas incluidas realizaron anualmente un cuestionario, se les hizo un examen físico y una radiografía de tórax y cada 4 meses una citología de esputo. La prevalencia variaba del 4,6‰ al 8‰ según el centro, siendo la radiografía la técnica más útil, acompañada ó no de citología positiva, que en un pequeño número de casos fue la única muestra diagnóstica. En los cánceres diagnosticados precozmente (83% resecables) el tratamiento quirúrgico lograba una supervivencia a 5 años del 80 %,

mientras que los pacientes diagnosticados por otros métodos, en pacientes sintomáticos, sólo alcanzaban una supervivencia del 10%. Los avances de las últimas décadas en biología molecular, anatomía patológica, broncoscopia y radiología son una base sólida para nuevas estrategias en diagnóstico precoz. Es, pues, necesario romper el dogma de la imposibilidad del diagnóstico precoz del cáncer de pulmón. (54).

La necesidad de cribaje de grandes poblaciones de riesgo limita los procedimientos a aquellos de precio asequible y que dependen de muestras fáciles de obtener, quedando otros para casos muy seleccionados, en los cuales el riesgo ó la sospecha de cáncer sea muy elevada. Dentro de las primeras están las técnicas de imagen y el análisis de esputo, sea por citología convencional ó con determinación de lesiones asociadas a tumor y estudio de oncogenes, y/ó con citometría de flujo. Entre las segundas, la fotodinamia y la búsqueda de alteraciones genéticas y marcadores biológicos con lavado broncoalveolar. Habrían de añadirse la PET, el SPECT y la determinación de componentes volátiles en aire exhalado.

1.-Historia clínica y exploración:

El cáncer de pulmón se diagnostica habitualmente por aumento de sintomatología respiratoria ó por hallazgo casual durante una exploración radiológica del paciente. Los síntomas ó signos detectados en el momento del diagnóstico dependen de la localización y del tamaño del tumor primario, de la localización y del tamaño de las metástasis, del grado de invasión de estructuras y órganos vitales así como de la presencia de síndromes paraneoplásicos. Por ejemplo, el cambio en el tipo de tos, el padecimiento de infecciones respiratorias frecuentes ó la aparición de hemoptisis; síntomas relacionados con la invasión locorregional son la parálisis frénica, el síndrome de la vena cava superior y el dolor

torácico. La diseminación a distancia la sugieren la presencia de sintomatología neurológica, el dolor óseo y la pérdida de peso (55). El hábito tabáquico, los antecedentes familiares y la exposición a carcinógenos ambientales, todos ellos apoyarán la sospecha de cáncer de pulmón. La exploración física se ha de centrar en la búsqueda de datos sobre pérdida de volumen pulmonar por atelectasia ó derrame pleural y exploración de la región supraclavicular y cervical en búsqueda de adenopatías.

Con la excepción de aquellos casos en los cuales el diagnóstico se produce de forma casual por la realización de una radiografía rutinaria ó bien en el seno de un programa de screening dirigido a población de fumadores asintomáticos, la mayoría de los pacientes con carcinoma de pulmón se diagnostican con enfermedad clínica. La presencia de estos síntomas se relaciona con diferencia significativa con la supervivencia.

Son necesarios programas de detección de síntomas precoces para el diagnóstico de esta enfermedad.

2.- Técnicas de imagen:

a) Radiografía convencional:

Existen tres fundamentos en la evaluación diagnóstica del paciente con carcinoma broncogénico: primero detectar el carcinoma (screening), segundo determinar la operabilidad del paciente (estadio) y tercero evaluar la respuesta al tratamiento (reestadio), en estos tres apartados la radiología juega un papel decisivo.

Aunque la radiografía de tórax se ha utilizado ampliamente en el cribaje poblacional del cáncer de pulmón, todavía no hay consenso sobre su empleo sistemático con este fin (56).

El diagnóstico tumoral del nódulo pulmonar solitario (NPS) va siendo cada vez más frecuente y en la clínica diaria se abre paso a la utilidad de la radiología (figura 1). En un estudio de 40 NPS detectados de modo correlativo, realizado por Libby (57) en pacientes con una media de edad de 65 años, resultaron ser malignos el 53% con diámetro medio de 1,8 cm., el 43% de los menores de 2 cm. y el 80% de los mayores de 2 cm. Es muy importante destacar que el 94% de ellos se hallaban en estadios quirúrgicos (I, II y IIIA). Si con un cribaje poblacional se considera una modesta reducción de la mortalidad de sólo un 10%, en EEUU se salvarían unas 14.000 vidas cada año, otro tanto en la UE y unas 100.000 en el mundo.

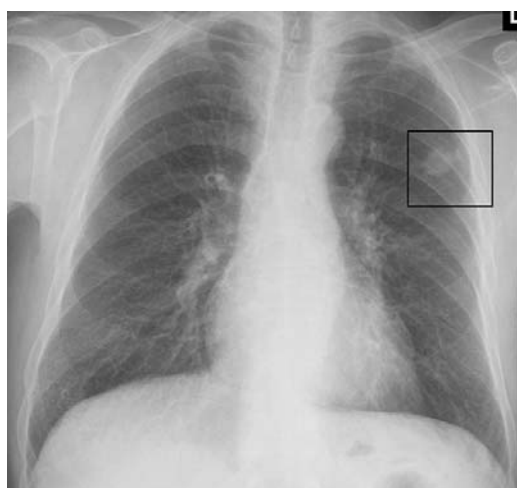


Figura 1. Radiografía de tórax: nódulo pulmonar en LSI.

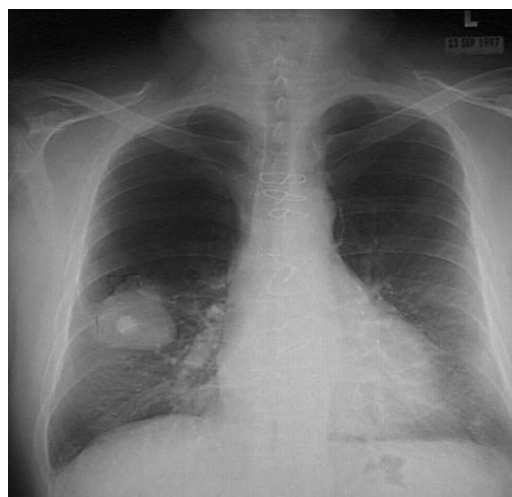


Figura 2. Radiografía de tórax de paciente con carcinoma de pulmón en LID.

Las radiografías simples de tórax pósterio-anterior y lateral siguen siendo el método más sencillo y práctico para identificar al paciente con cáncer de pulmón (figura 2). Suele ser patológica cuando el cáncer se hace sintomático produciendo opacidades secundarias bien a obstrucción bronquial (atelectasias) ó bien a su extensión ganglionar, teniendo en cuenta que el límite de visibilidad radiológica para un nódulo pulmonar es de 6 mm siempre que no esté superpuesto a una costilla. Si el tumor es de localización central puede no ser visible hasta superar los 2 cms de diámetro, camuflándose en la opacidad del mediastino ó de los hilios. Los patrones radiológicos más frecuentes son: hiliares (prominencia hilar, masa hilar ó masa perihiliar); parenquimatosos (masa de menos de 4 cms, masa de más de 4 cms, masa apical, múltiples masas, zonas de mayor radiotransparencia y evidencia de obstrucción bronquial); estructuras intratorácicas extrapulmonares (masas mediastínicas, erosiones de la pared costal y derrame pleural) (58).

b) Tomografía axial computarizada de baja radiación (TAC-LD):

La utilización de la TAC helicoidal de baja radiación está ofreciendo resultados interesantes (figura 3). El *Early Lung Cancer Project* (ELCAP) fue creado para evaluar la prevalencia y la incidencia de cáncer de pulmón con TAC-LD limitada a la población de alto riesgo de cáncer de pulmón. ELCAP ha estudiado 1000 voluntarios libres de síntomas, mayores de 60 años, fumadores de cigarrillos (de al menos 10 cajetillas/año), sin haber desarrollado un cáncer previo, y que estuvieran en condiciones de ser sometidos a cirugía torácica. Se realizaron radiografías de tórax (Rx) y TAC-LD a cada participante. La investigación diagnóstica de los nódulos no calcificados detectados se llevó a cabo según recomendaciones del ELCAP, las cuales incluían seguimiento a

corto plazo con TAC de alta resolución (TAC-AR) para los nódulos no calcificados más pequeños. La TAC-LD detectó nódulos en 233 participantes (23%), mientras que por Rx fueron detectados sólo 68 (7%). Correspondían a enfermedad maligna 27 (2,7%) detectados por TAC-LD y 7 (0,7%) por Rx; y en estadio I, 23 (2,3%) y 4 (0,4%), respectivamente, por cada técnica. De los 27 detectados por TAC-LD, 26 fueron resecables. Ningún participante sufrió toracotomía por un nódulo benigno. Así pues, los trabajos muestran que la TAC-LD mejora la probabilidad de detección de pequeños nódulos no calcificados y potencialmente curables. Aunque los falsos positivos con TAC-LD son comunes, pueden manejarse adecuadamente con un uso razonable de procedimientos diagnósticos invasivos. Resultados similares se repiten en trabajos actuales (59,60). Además se pueden diagnosticar tumores complicados, con derrame pleural (figuras 3 y 4).

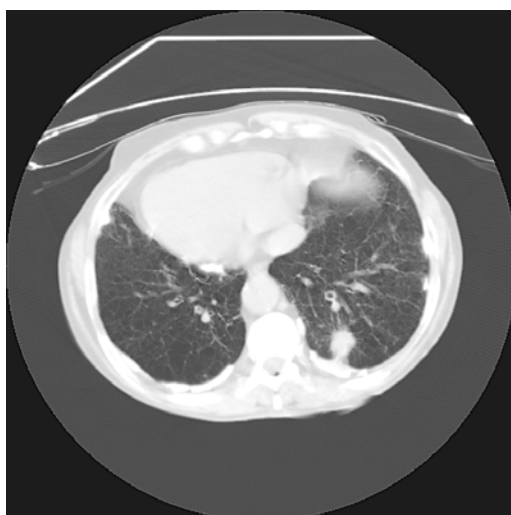


Figura 3. Tomografía axial computarizada de carcinoma de pulmón en LII.

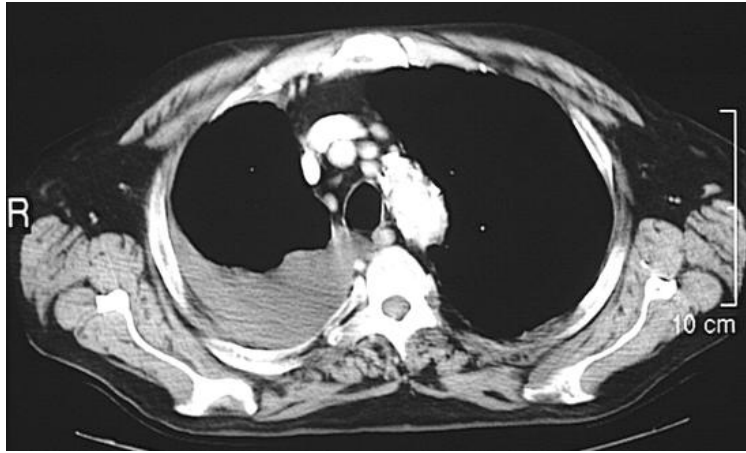


Figura 4.- Imagen de tomografía axial computarizada de un derrame pleural neoplásico en paciente diagnosticado de cáncer de pulmón.

c) Resonancia magnética nuclear (RMN):

La introducción en la clínica humana de la resonancia magnética (RMN) no ha supuesto prácticamente ningún avance en el campo del estudio preoperatorio del cáncer de pulmón. Solamente en algunos casos está justificada su utilización, como son los tumores situados en localización paravertebral en los que es necesaria la evaluación del canal espinal, y en algunos tumores con posible invasión de los grandes vasos mediastínicos en los que la RMN puede ofrecer un análisis más exacto que la TAC (61). Así mismo en situaciones especiales como el embarazo (62).

d) Tomografía por Emisión de Positrones (PET):

La FDG-PET es una técnica que permite discriminar las lesiones en función de su actividad metabólica. Con diferencia, las lesiones metabólicamente más activas son las neoplasias malignas, más a mayor agresividad. Este comportamiento ha permitido su utilización en el diagnóstico del nódulo pulmonar solitario para diferenciar nódulos malignos de los de causa benigna. La sensibilidad y especificidad son elevados (63).

La PET es relativamente poco específica para malignidad. Son frecuentes falsos positivos por lesiones inflamatorias ó infecciosas metabólicamente activas, como nódulos reumatoides, lesiones tuberculosas ó fúngicas, heridas quirúrgicas ó lesiones por radioterapia (64). Los falsos negativos son menos frecuentes y pueden deberse a tumores con baja actividad metabólica, como el carcinoma bronquioalveolar, el carcinoide, algunos adenocarcinomas ó lesiones metastásicas; el pequeño tamaño de las lesiones, poco sensible por debajo de 10 mm.; y el aumento de glucosa sérica, sobretodo de forma aguda. En el momento actual el precio de la PET con F-18-fluorodeoxiglucosa hace imposible su utilización para cribaje poblacional de cáncer de pulmón.

Una técnica parecida utilizando como marcador ^{99}Tc -depreotido, SPECT, se presenta como una alternativa más barata. No obstante, no existen todavía estudios comparativos entre ambos métodos. Probablemente se empleo actual en diagnóstico precoz se limite a grupos muy seleccionados en los que la sospecha de cáncer broncogénico sea muy elevada, en combinación con la TAC, y para seguimiento de posibles recidivas.

Diagnóstico del nódulo pulmonar solitario (figura 5):

El nódulo pulmonar solitario (NPS) es relativamente frecuente en la práctica clínica (65,66). La prevalencia de malignidad es muy variable entre series, pero en general se sitúa

en torno al 50%. Hay muchas enfermedades que pueden manifestarse como NPS: NPS benignos, como granulomas inactivos ó hamartomas y NPS malignos, la mayoría carcinomas broncogénicos. La distinción entre NPS benignos y malignos no es fácil. Entre ellos hay diferencias clínico-radiológicas, pero no son lo suficientemente sensibles ó específicas. Con la TAC torácica se consigue una mejor valoración de las características radiológicas, pero de nuevo no permite una diferenciación segura entre benignos y malignos. Teniendo en cuenta la capacidad de la FDG-PET para diferenciar lesiones en función de su metabolismo, el estudio del NPS ha sido una de las principales indicaciones. La captación de FDG es mayor en las lesiones malignas que en las benignas. Los resultados han demostrado una sensibilidad entre 89% y 100% y una especificidad entre 52% y 100%. La sensibilidad es superior en lesiones de mayor tamaño. En NPS menores de 15 mm. la sensibilidad fue 83% frente al 100% en los mayores de 15 mm. Puede haber falsos negativos hasta en el 5% de NPS malignos (63). Los falsos negativos se asocian a mala técnica, pequeño tamaño, pues el umbral de detección es en torno a 7 mm.; ó a tumores de baja actividad metabólica como carcinomas bronquioalveolares y algunos adenocarcinomas. También la hiperglucemia puede ser causa de falsos negativos. Los falsos positivos son más frecuentes; lesiones inflamatorias como la tuberculosis, neumonías, micosis y otras infecciones pueden dar imágenes calientes (63,64).

En los últimos años ha cobrado gran protagonismo el PET-TAC como unión de ambas pruebas (figura 6).

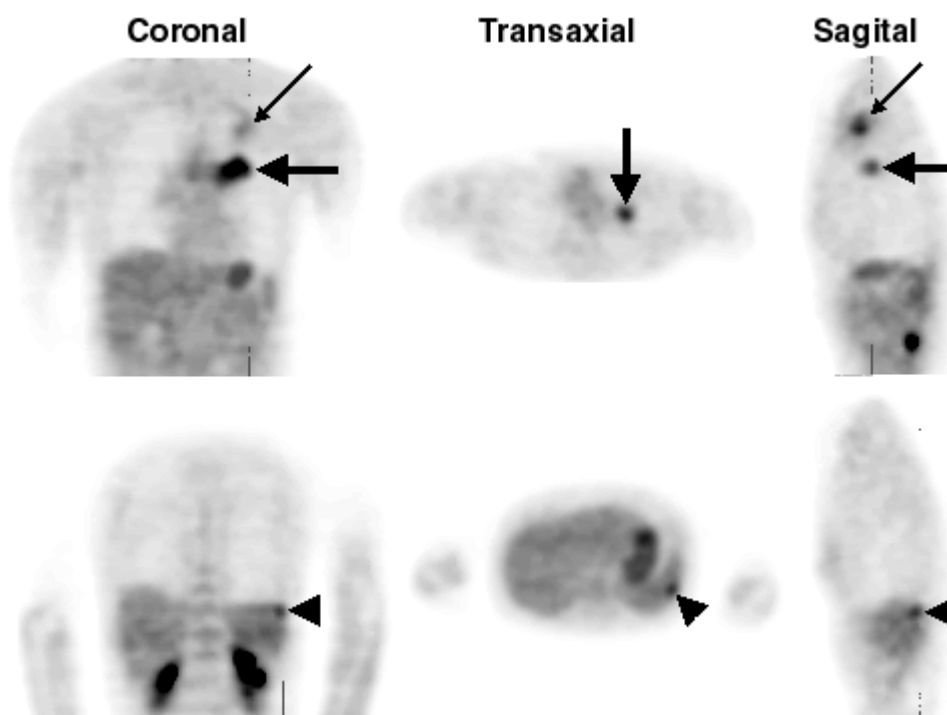


Figura 5.- Distintas proyecciones de una tomografía por emisión de positrones de un carcinoma de pulmón.

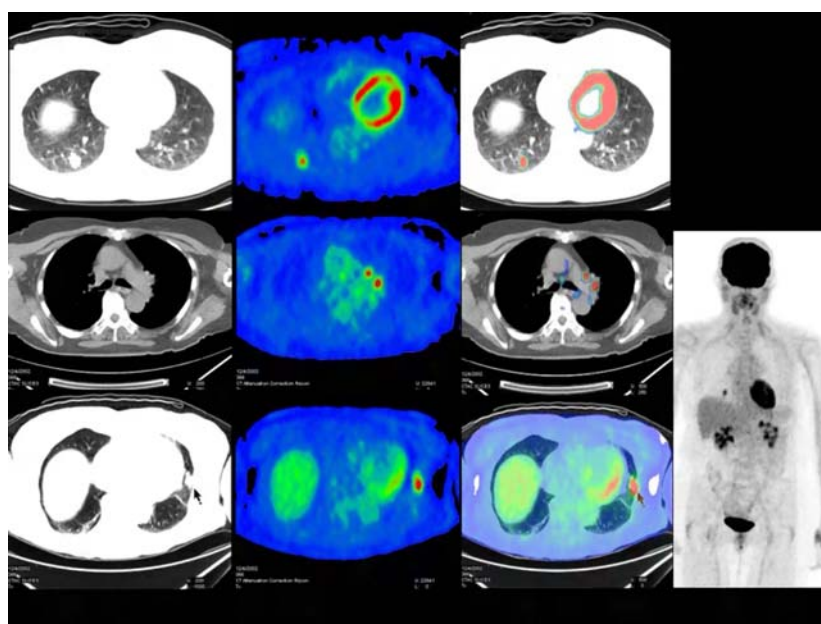


Figura 6. Imágenes de PET-TAC en paciente con neoplasia pulmonar.

3.- Estudio del esputo:

De las muestras citológicas para el diagnóstico del cáncer de pulmón: esputo, cepillado bronquial, aspirado bronquial, lavado broncoalveolar, punción-aspiración con aguja fina y citología del derrame pleural, la única aplicable como cribaje es el esputo, de muy fácil obtención y muy representativa del árbol bronquial.

a) Citología convencional:

El estudio citológico del esputo para el diagnóstico del cáncer broncogénico está en duda como método de cribaje, al menos en lo que se refiere a la citología convencional, sin objetivarse mejora al rendimiento obtenido con la radiografía de tórax (67). Este método diagnóstico se utiliza especialmente para el estudio del cáncer de pulmón, tanto primario como secundario, por lo que es una técnica de fácil y cómoda obtención, así como de alta rentabilidad diagnóstica (68). Su inicio se remonta a mediados del siglo pasado en el que ya se describieron pacientes afectos de cáncer de pulmón con células malignas en el esputo (69). Su finalidad debe ser tanto demostrar la presencia de tumor como determinar su estirpe histológica.

Es un método sencillo en el diagnóstico del cáncer de pulmón aunque su fiabilidad es variable. La sensibilidad varía de unas series a otras, según se considere únicamente la presencia de células neoplásicas ó se trate de precisar el tipo histológico, teniendo una gran importancia en este sentido tanto el número de esputos observados como la calidad de la muestra y la experiencia del patólogo. Así en pacientes con el diagnóstico confirmado por otros métodos, una muestra de esputo adecuada consigue una positividad del 40% que aumenta al 56%, 69% y 85% con la segunda, tercera y cuarta muestra, situándose en general la sensibilidad entre el 60 y el 80%. También la especificidad varía entre el 99%

cuando se distinguen sólo entre esputos con signos de malignidad ó sin ella y el 73% cuando se establece el tipo histológico (70).

Otro factor a tener en cuenta es la localización del tumor respecto al árbol bronquial y su tamaño. En general los tumores localizados en bronquios principales tienen una mayor rentabilidad diagnóstica (60-85%) que las lesiones periféricas (40-50%) e incluso algunos autores opinan que sólo resulta positiva en el carcinoma epidermoide (71).

b) Alteraciones morfológicas preneoplásicas de la mucosa bronquial:

En las células del epitelio bronquial aparentemente normales que se encuentran en la vecindad de tumores malignos se han observado ciertos cambios del patrón cromatínico del núcleo denominados MACS (*malignant associated changes*), que no resultan visibles habitualmente, pero sí con análisis morfométricos, y que se suponen causados por la presencia cercana de cambios francamente neoplásicos preinvasivos ó invasivos (72). Han sido identificados en el 74% de personas que luego han desarrollado carcinoma de pulmón, precediendo al diagnóstico de malignidad en más de 12 meses.

Se consideran lesiones precursoras de carcinoma epidermoide invasor la hiperplasia de células basales, la metaplasia escamosa, la displasia celular y el propio carcinoma in situ; precursores de adenocarcinoma son la hiperplasia adenomatosa atípica y el adenoma bronquioalveolar; y de los tumores neuroendocrinos es la hiperplasia idiopática difusa de células neuroendocrinas. La metaplasia escamosa y los diferentes grados de displasia se observan con más frecuencia en las células del esputo de individuos fumadores.

c) Citología de flujo:

La imagen citométrica automatizada representa un nuevo y sensible método para el análisis cuantitativo de la estructura nuclear y del contenido de ADN de las células exfoliadas del árbol bronquial. Se utiliza desde 1995 y consiste en el análisis de extensiones citológicas con un microscopio de alta resolución unido a una videocámara CCD. Son muy interesantes los trabajos de Marek. La sensibilidad y especificidad obtenidas con citometría de flujo sobre 20 pacientes diagnosticados con certeza de carcinoma broncogénico fueron de 75% y 89,8%. La eficiencia diagnóstica fue de 89,3%. Combinado la citometría de flujo y la citología convencional se incrementó la sensibilidad hasta un 80%, sin pérdida notable de la especificidad (89,7%) y con eficiencia diagnóstica de 89,7%.

d) Técnicas genéticas:

Según dos estudios, existe evidencia de mutaciones de K-ras en esputo, 1 y 4 años antes del desarrollo del tumor (73). La hipermetilación de p16 es una alteración molecular común que puede estar presente en lesiones preneoplásicas. La detección de alteraciones en microsatélites en muestras histológicas de epitelio bronquial normal y muestras citológicas con mínima atipia, apuntan a su posible aplicación como marcador en el diagnóstico precoz. En algunas lesiones preneoplásicas del pulmón, como son la hiperplasia (aunque no en la hiperplasia adenomatosa atípica), la displasia y el propio carcinoma in situ, la actividad de telomerasa está aumentada. Mao et al (74) en 1994 estudiaron esputos almacenados de 15 pacientes que posteriormente sufrieron un adenocarcinoma broncogénico. En 10 piezas tumorales se encontraron mutaciones de los genes ras ó p53 y en 8 de estos casos se identificaron mutaciones iguales en las

células de esputos obtenidos más de un año antes del diagnóstico del carcinoma. La positividad de p53 por inmunohistoquímica en zonas bronquiales con metaplasia supone un valor predictivo para tumor de un 91%.

4.- Endoscopia respiratoria:

Las técnicas endoscópicas, cada vez más desarrolladas y comprobada su efectividad durante muchos años, no es posible utilizarlas como cribaje poblacional dado el tiempo que requieren. No obstante, su aplicación es obligada en pacientes con alta sospecha de padecer carcinoma broncogénico, por ejemplo, con citología de esputo positiva sin evidencia radiológica (Tx).

Es el método con el que se consigue el mayor número de diagnósticos de certeza en el cáncer de pulmón (75) (figura 7). Con un fibrobroncoscopio estándar se pueden visualizar todos los bronquios segmentarios (hasta la segunda ó tercera división subsegmentaria), aunque en un 30% de los casos las neoplasias no pueden ser visualizadas por este método. La fibrobroncoscopia permite realizar las siguientes técnicas diagnósticas: broncoaspirado, legrado bronquial, biopsia bronquial, biopsia transbronquial, punción aspirativa transbronquial y lavado broncoalveolar.

Algunas modalidades actuales son:

a) Fotodinamia diagnóstica:

Se utiliza la autofluorescencia (76) (figura 7), capacidad de las células de fluorecer al ser estimuladas por la exposición a una fuente de luz de determinada longitud de onda, diferenciando entre células benignas y malignas.

b) Lavado broncoalveolar:

Como técnica que necesita de la broncofibroscopia no es aplicable para cribaje poblacional, pero tiene un papel en la detección tumoral precoz.

c) Detección de alteraciones genéticas:

La validez de las muestras de lavado broncoalveolar está en fase experimental. Se han detectado mutaciones en el codón 12 del oncogen K-ras en un 56% de los casos de adenocarcinoma, en un 20% de carcinomas de células grandes y en ningún caso de epidermoide. En el lavado broncoalveolar, la detección de mutaciones del oncogen K-ras posee mayor sensibilidad que el estudio citológico.

d) Broncoscopia virtual (figura 8).

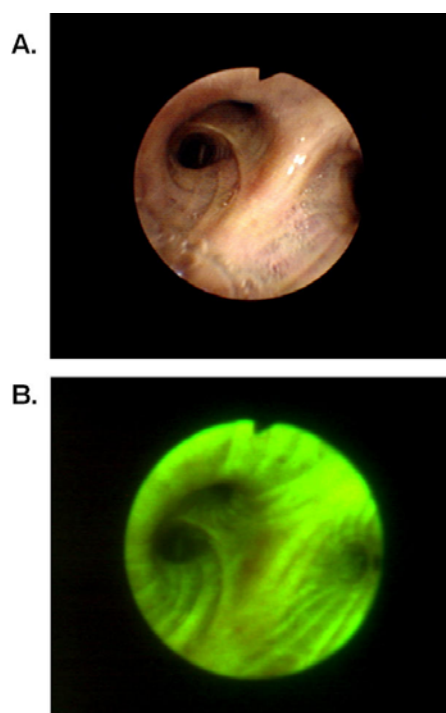


Figura 7. Endoscopia bronquial:
A.- Imagen con broncoscopio flexible.
B.- Broncofibroscopia con fluorescencia.

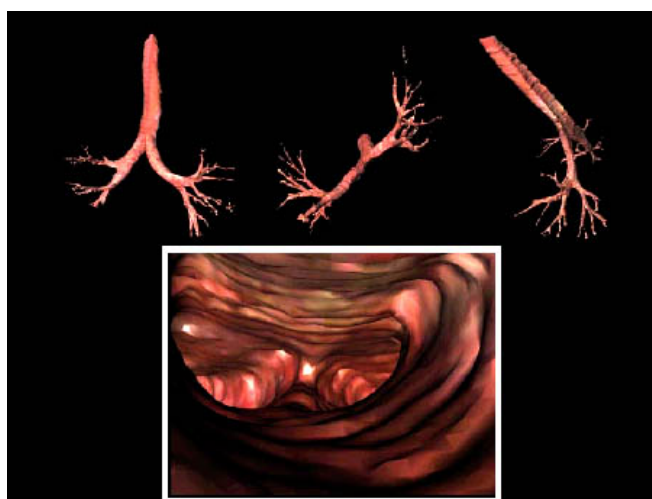


Figura 8. Imagen de broncoscopia virtual.

5.-Punción percutánea:

Se lleva a cabo para obtener diagnóstico histológico en las siguientes situaciones:

- Diagnóstico de nódulos pulmonares solitarios.
- Tipificación del patrón celular de imágenes multinodulares.
- Diagnóstico etiológico en procesos pulmonares de evolución tórpida.
- Diagnóstico de masas tumorales mediastínicas.
- Valoración citológica de posibles lesiones metastásicas en hueso, glándula suprarrenal ó hígado.

Presenta unas contraindicaciones absolutas como la sospecha de quiste hidatídico pulmonar y otras relativas como el enfisema bulloso, la hipertensión pulmonar y las alteraciones de la coagulación.

La técnica utilizada consiste en la localización previa radiológica y punción mediante técnica estéril, usando agujas biseladas siendo las más comunes las de Rotex y Chiba. La tasa de mortalidad debida a esta técnica ha sido descrita en un 0,1%, siendo la incidencia de las complicaciones entre un 17 y un 46 %; las más frecuentes son: el neumotórax (25 %), la hemorragia y la embolia gaseosa. Excepcionalmente han sido consideradas como complicaciones de esta técnica el implante de células neoplásicas en el trayecto de punción y la diseminación de células tumorales por vía linfática ó hemática (77).

Mediante esta técnica se han descrito resultados positivos en el 80% de los casos al utilizar el procedimiento de agujas cortantes y del 87% con el sistema aspirativo (PAAF), referidos estos datos a la evaluación de los nódulos solitarios de etiología maligna, ya que la rentabilidad diagnóstica disminuye cuando se trata de procesos benignos hasta el 60%.

DIAGNÓSTICO DE EXTENSIÓN:

A) EXTENSIÓN LOCAL:

1.-Tomografía axial computerizada:

En la actualidad la Tomografía Axial Computerizada (TAC) es una de las técnicas más utilizadas en el estudio de extensión del carcinoma broncogénico ya que se considera uno de los procedimientos radiológicos no invasivos más idóneo tanto para aportar imágenes de extensión local como para valorar posibles metástasis (78). La TAC es útil en el diagnóstico de extensión del carcinoma broncogénico en dos vertientes: valoración de la extensión a pared costal por una parte y valoración de la afectación ganglionar mediastínica por otra. Ambas importantes en cuanto a determinar el estadio de la enfermedad. Además la TAC presenta una alta sensibilidad para identificar nódulos pulmonares de al menos 3 mm. de diámetro.

Por lo que respecta al primer apartado, algunos autores describen un valor predictivo negativo para la infiltración de la pared costal del 94% , mientras que una TAC positiva para la pared debería ser confirmada por otros métodos (valor predictivo positivo 53%) (79). En cuanto al segundo apartado, se considera a la TAC como un procedimiento de rutina en la estadificación de pacientes con carcinoma bronquial, partiendo del concepto de que el drenaje linfático para los diferentes lóbulos pulmonares permanece constante. Así se han presentado en la literatura numerosos trabajos que evalúan la afectación ganglionar mediastínica en pacientes con cáncer de pulmón (80). Sin embargo hay pocos estudios de valoración ganglionar mediastínica en sujetos sanos. Uno de los primeros trabajos publicados, el de Schnyder, a partir de 127 sujetos sanos en los cuales estudió el espacio pretraqueal retrocava, presentaba un 80% de ganglios normales con un diámetro medio de

5.5 mm. Posteriormente se han desarrollado trabajos que comparan los hallazgos de la TAC con el resultado histológico definitivo, con resultados en cuanto a sensibilidad y especificidad muy variables según cada estudio. En general la sensibilidad de la TAC para predecir la ausencia de afectación metastásica ganglionar es baja globalmente (43%). Sin embargo recientes estudios demuestran que pacientes con metástasis microscópicas descubiertas en el momento de la toracotomía, tienen buena supervivencia, siempre que el tumor primario y las metástasis ganglionares se resequen en su totalidad. Por tanto cuando la TAC mediastínica no aprecia metástasis ganglionares es razonable proceder directamente a toracotomía, aunque algunos autores excluyen de este caso los tumores centrales, que con un valor predictivo negativo del 68% hacen más aconsejable la mediastinoscopia previa. Por el contrario, cuando una TAC muestra adenopatías mediastínicas es aconsejable realizar mediastinoscopia ó mediastinotomía previa a la cirugía ya que la TAC no puede diferenciar entre ganglios reactivos y enfermedad metastásica.

2. Gammagrafía isotópica:

La aplicación de los estudios isotópicos al diagnóstico y estadificación preoperatorio del carcinoma broncogénico tiene un valor muy limitado, debido fundamentalmente a la baja especificidad de la técnica. En ocasiones se ha utilizado la gammagrafía con citrato de galio ó con cobalto-bleomicina para la evaluación de la invasión del mediastino una vez diagnosticado ya el tumor primario. Para el estudio de la afectación ósea metastásica tampoco se debe realizar gammagrafía rutinaria. Solamente en el caso de tumores avanzados con alta sospecha clínica se obtiene rentabilidad del empleo de esta técnica.

3.-Tomografía por emisión de positrones:

Esta técnica la podemos emplear para:

a.- Estadificación ganglionar mediastínica:

El mediastino es la localización más frecuente de metástasis del carcinoma broncogénico. La identificación de pacientes con afectación ganglionar mediastínica, N2 ó N3, es de gran valor pronóstico e influye en la terapéutica (66). La radiografía torácica es poco sensible para la detección de adenopatías. La TC es un método mucho mejor en la evaluación anatómica del mediastino, pero su sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de metástasis son bajas (60% y 77%, respectivamente) (81). La resonancia magnética no mejora estas cifras (64). La estadificación mediastínica más segura es la mediastinoscopia cervical, con alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico de metástasis en las adenopatías accesibles a la técnica. Este procedimiento requiere anestesia general y cirujanos experimentados, supone cierta morbilidad y consume recursos.

Con la FDG-PET los rangos de sensibilidad en el diagnóstico de metástasis en diversos estudios (82) van del 86%, los de especificidad del 85% al 100% y los valores predictivos positivo y negativos del 85% y del 75% al 69%, repectivamente.

Su principal utilidad sería evitar exploraciones mediastínicas invasoras, mediastinoscopia ó mediastinotomía, en aquellos pacientes con resultado negativo, considerando directamente la cirugía terapéutica. Su alto valor predictivo negativo es constante en casi todos los estudios y algunas causas de falsos negativos se deben a un N2 "mínimo", por invasión pequeña ó microscópica de ganglios mediastínicos inferiores, un subgrupo de pacientes que pueden tener mejor pronóstico que otros N2 si extrapolamos los resultados de supervivencia en algunas experiencias con N2 "mínimo" en toracotomía ó

mediastinoscopia. Un resultado positivo debe confirmarse mediante estudio citohistológico si las opciones terapéuticas dependen de ello.

b.- Detección de metástasis sistémicas:

La PET permite la exploración de todo el cuerpo para detección de metástasis. En la misma exploración puede evaluarse la lesión pulmonar, el mediastino y posibles metástasis sistémicas (63).

Con la PET se evidencian metástasis no sospechadas tras estudio convencional en un 6 a un 19%. Además se clasifican como negativos hallazgos sugerentes de metástasis en la TC en un 11 y 14% de los pacientes en un estudio (83). La sensibilidad en un estudio de 102 pacientes fue de 82% y la especificidad de 93%.

La FDG-PET es adecuada para la valoración de metástasis hepáticas, similar a la TAC, para la detección de metástasis suprarrenales, donde tiene una sensibilidad similar a la TAC, pero mucha mayor especificidad, metástasis óseas, con sensibilidad y especificidad probablemente superiores a las de la gammagrafía ósea y pulmonares ipsi ó contralaterales. No es adecuado para valorar metástasis en sistema nervioso central (SNC) por la alta captación fisiológica de FDG por el tejido nervioso cerebral. Un resultado positivo, si es determinante en la evaluación pronóstica y terapéutica, debe confirmarse, pues no es lo bastante específico (83,84).

c.- Evaluación de curación y recurrencia:

Según diferentes estudios la disminución de la captación en la PET tras el tratamiento radio ó quimioterápico se correlaciona con la respuesta terapéutica, mejor que

la disminución de tamaño en la TAC, y su normalización fue un dato de buen pronóstico (63). Esto podría tener utilidad en tratamientos neoadyuvantes en pacientes con N2.

En un trabajo 60 pacientes, entre 126 estudiados, tienen lesiones persistentes ó recurrentes tras tratamiento inicial (85). La PET fue positiva en todos ellos (sensibilidad 100% frente al 71% de la TC). Hubo 5 falsos positivos (especificidad 92%, similar a la de la TAC). Así pues, su valor parece ser mayor para descartar enfermedad que para confirmarla.

4.-Mediastinoscopia y mediastinotomía:

Es un método complementario en la estadificación del carcinoma broncogénico que se utiliza para explorar los grupos ganglionares (86). El examen transcervical con biopsia de los ganglios mediastínicos fue introducida por Carls en 1959 (87). Posteriormente se describió la mediastinotomía paraesternal anterior (Stemmer 1965) en la que se reseca el segundo y tercer cartílago costal penetrando al mediastino para obtener información especialmente en el lado izquierdo donde la región subaórtica se explora mal por vía cervical y finalmente en 1979 París y cols. describen la hilioscopia ó pleuromediastinoscopia como modificación de la técnica anterior, abriendo la pleura para explorar la vertiente externa del mediastino así como la del hilio. La mediastinoscopia permite el acceso a los ganglios mediastínicos superiores, en las regiones 2, 4, 7 y 10. Los ganglios de las regiones 5 y 6 se biopsian por medio de mediastinotomía anterior ó mediastinoscopia transcervical ampliada. La mediastinoscopia se acompaña de una morbilidad mínima (2-3 %) y una mortalidad casi inexistente (0-1 %), y sus resultados son superiores a los obtenidos mediante TAC ó RM. La mediastinoscopia se realiza mediante una pequeña incisión supraesternal hasta alcanzar la fascia pretraqueal, y tras la disección

roma del espacio paratraqueal, mediante la introducción del mediastinoscopio, se puede obtener una visión directa (y realizar biopsia) de los ganglios paratraqueales, del ángulo traqueobronquial y subcarinales.

Ginsberg et al (88) han descrito la mediastinoscopia transcervical extendida, en la que a través de una incisión entre la carótida izquierda y el tronco innominado realizan una disección lateral a la aorta que permite la visualización y biopsia de los ganglios de los niveles 5 y 6.

El lóbulo superior izquierdo posee un drenaje linfático hacia los ganglios subaórticos y preaórticos, los niveles 5 y 6, además de la clásica diseminación hacia las estaciones 10, 7, 4 y 2. Los niveles 5 y 6 no son accesibles para la mediastinoscopia estándar. Por ello se popularizó la mediastinoscopia anterior de McNeil y Chamberlain para las lesiones de esta localización. Se accede mediante una incisión transversa en el segundo espacio intercostal izquierdo, exactamente lateral al borde esternal. Se dividen los músculos intercostales lateralmente a la arteria mamaria interna. En la mayor parte de los pacientes no es precisa la resección del cartílago costal. La mediastinostomía permite la evaluación de la resecabilidad de las lesiones subaórticas. La incidencia de complicaciones postoperatorias, incluyendo la hemorragia, el neumotórax, la lesión de la arteria mamaria y la infección de la herida, es significativamente mayor que la acontecida tras la realización de la mediastinoscopia transcervical.

5.-Toracoscopia:

Este método, introducido por Jacobeus en 1910 permite la amplia visualización de toda la cavidad pleural, y la toma de biopsias selectivas en las áreas sospechosas y, al mismo tiempo, si se establece el diagnóstico de derrame pleural metastásico, realizar

pleurodesis como procedimiento paliativo del derrame pleural recidivante. Como complicaciones se pueden presentar empiemas, hemorragias, enfisema subcutáneo, invasión tumoral del trayecto y fistula broncopleural. La mortalidad oscila alrededor del 0,09%.

En la actualidad se está utilizando no sólo como procedimiento diagnóstico, sino también como terapéutico, ya que la aparición de las modernas máquinas de autosutura por vía endoscópica, permiten la resección de bullas en el caso de neumotórax, ó la resección de pequeñas lesiones periféricas (89).

B) EXTENSIÓN METASTÁSICA:

1.- EXTENSIÓN HEPÁTICA:

Puede ser sospechada con relativa especificidad por la alteración de enzimas hepáticas como Fosfatasa Alcalina y Gammaglutamil Transferasa, aunque es mejor apreciada por otros métodos como la ecografía y la TAC (59,90) la cual es un procedimiento diagnóstico incruento que permite apreciar lesiones de hasta 1 cm de diámetro. Las metástasis hepáticas son frecuentes en todos los tipos histológicos del carcinoma broncogénico, observándose en el 35% ó más de los casos de necropsia. Los síntomas característicos de la afectación hepática son el dolor, la hepatomegalia y la presencia de nódulos palpables. Se presentan con escasa frecuencia ictericia y ascitis, generalmente producida por obstrucción de la vía biliar extrahepática por adenopatías, acompañándose en estos casos de otros signos de fracaso hepático.

2.-EXTENSIÓN CEREBRAL:

Las metástasis cerebrales son la segunda causa de muerte en el paciente con cáncer de pulmón, después de la insuficiencia respiratoria. La incidencia es mayor en los estadios avanzados y en supervivencias prolongadas y varía también de acuerdo con el tipo histológico. Así el carcinoma epidermoide metastatiza en un 15% de los casos mientras que el resto de los tumores lo hace en un 30%. El número de casos encontrados depende del método diagnóstico, siendo inferior cuando se utiliza solamente el diagnóstico clínico y aumenta al utilizar medios como el TAC. Algunos autores aconsejan este procedimiento diagnóstico especialmente en el caso de SCLC ya que más de un 10% de los pacientes asintomáticos presentan metástasis cerebrales.

El tratamiento quirúrgico estará indicado en pacientes jóvenes con metástasis cerebrales solitarias e intervalo prolongado libre de enfermedad. También puede aplicarse a pacientes que debutan con una metástasis cerebral solitaria y cuyo tumor primario puede ser controlado con cirugía ó radioterapia. En este caso, cuando ambas lesiones aparecen al mismo tiempo y las dos parecen resecables, está indicado intervenir quirúrgicamente en primer lugar la metástasis cerebral, y en un segundo tiempo la lesión primaria pulmonar (59).

3.-EXTENSIÓN ÓSEA:

Es una localización frecuente de extensión metastásica en el carcinoma broncogénico. Ha sido descrita en autopsias de pacientes con cáncer de pulmón una incidencia de metástasis óseas del 25% (91), y una distribución por tipos histológicos que oscila entre el 20% de los carcinomas epidermoides, el 36% de los adenocarcinomas, el 30% en los de células grandes y el 37% de los de células pequeñas.

La localización más frecuente es la vertebral con un 70%, seguida de la pelvis con un 40% y el fémur con un 25%. Suelen ser metástasis osteolíticas aunque algunas, especialmente las del adenocarcinoma y del de células grandes, pueden ser osteoblásticas.

4.-EXTENSIÓN SUPRARRENAL:

Se trata de una extensión asintomática en el 90% de los casos, que ha sido descrita con una incidencia del 15% a partir de estudios con TAC abdominal. Esta cifra se eleva al 27% de las necropsias en pacientes con cáncer de pulmón. Se presenta con una frecuencia que oscila, según los tipos histológicos entre el 59% del carcinoma de células grandes, el 55% del de células pequeñas, el 50% del adenocarcinoma y el 23% del epidermoide.

Por tanto, es indispensable la realización de un estudio con TAC abdominal, aunque el descubrir una hipertrofia suprarrenal no se traduce más que en un 30% de los casos biopsiados en metástasis (92). Aunque la cirugía se ha discutido, en algunos trabajos obtienen una supervivencia del 38% a los 5 años en metástasis adrenales ocurridas después de 6 meses del diagnóstico y tratamiento del tumor pulmonar primario (93).

ESTADIFICACIÓN CLÍNICA

El sistema de clasificación anatómica se inicia en 1946 cuando Denoix introdujo el sistema TNM, que fue adoptado por la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC) y la American Joint Committe for Cancer Staging (AJCC) en 1974 (94,95).

Este sistema utiliza tres parámetros (TNM) para describir la extensión:

- la extensión del tumor primario (T).
- la ausencia ó presencia de metástasis ganglionares regionales (N).
- la ausencia ó presencia de metástasis a distancia (M).

El parámetro T se define tanto por el tamaño tumoral, como por su localización endobronquial y por la estructura afectada. El parámetro N define la ausencia ó presencia de afectación ganglionar y tiene 3 grados de extensión: pulmonar-hiliar, mediastínica ipsilateral y mediastínica-hiliar contralateral ó supraclavicular. Por último el parámetro M indica la presencia ó ausencia de diseminación metastásica.

En años sucesivos se fue completando y refinando hasta que en 1997, tras el análisis de más de 5.000 pacientes con por Mountain, se publicó la última estadificación TNM del carcinoma broncogénico (96) (tabla II).

Tabla II. Clasificación de Mountain et al. para la estadificación del carcinoma broncogénico (1997).

Tumor (T):

T0 Sin evidencia de tumor pulmonar primario.

Tx Examen citológico positivo. Sin evidencia radiológica ni broncoscópica.

Tis Carcinoma in situ.

T1 Tumor con diámetro menor de 3 cm., rodeado de pulmón o pleura visceral, y sin afectación del bronquio lobar.

T2 Tumor de diámetro $>$ de 3 cm, o de cualquier tamaño que invade la pleura visceral o que presenta atelectasia ó neumonitis obstructiva asociada sin afectar al pulmón entero. Invasión bronquial a más de 2 cm distal de la carina.

T3 Tumor con invasión de la pared torácica, diafragma o pericardio. Tumor que invade el bronquio principal en los 2 cm cercanos a la carina, sin afectar a ésta. Atelectasia ó neumonitis obstructiva asociada del pulmón entero.

T4 Tumor con invasión mediastínica, que afecta al corazón, grandes vasos, traquea, esófago, cuerpo vertebral, carina ó presencia de derrame pleural maligno. Nódulo(s) tumoral(es) en el mismo lóbulo.

Ganglios (N):

N0 No existe afectación ganglionar.

N1 Afectación de ganglios peribronquiales y/ó hiliares ipsilaterales.

N2 Invasión de ganglios subcarinales ó mediastínicos ipsilaterales.

N3 Invasión de ganglios mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos ó supraclaviculares ipsilaterales ó contralaterales.

Metástasis (M):

M0 Sin evidencia de metástasis

M1 Metástasis a distancia

Estadio	T	N	M
Oculto	Tx	N0	M0
0	Tis	N0	M0
IA	T1	N0	M0
IB	T2	N0	M0
IIA	T1	N1	M0
IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
IIIA	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
IIIB	Cualquier T	N3	M0
	T4	Cualquier N	M0
IV	Cualquier T	Cualquier N	M1

Para la clasificación de la afectación ganglionar se emplean dos mapas ganglionares: el de Naruke, adoptado como mapa oficial de estadificación por la Sociedad Japonesa del Carcinoma Broncopulmonar (figura 9) (97,98); y el de Mountain-Dresler de la American Thoracic Society (MD-ATS), adoptado por el resto de países (99) (figura 10).

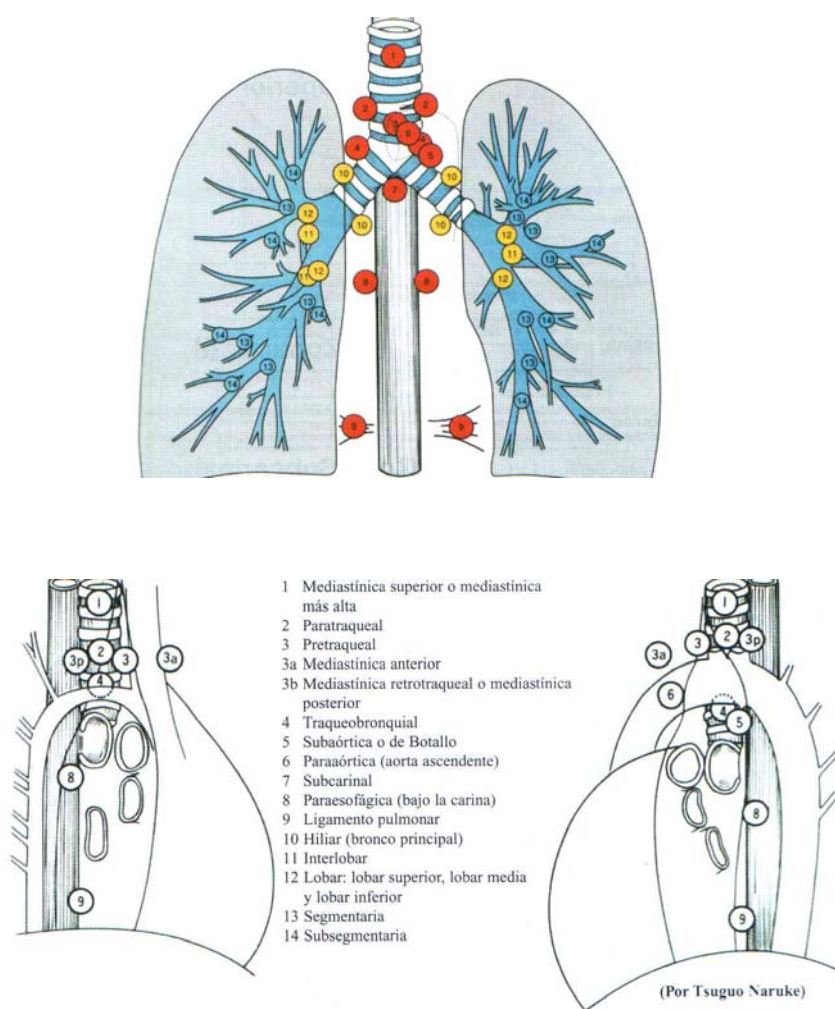


Figura 9.- Mapa ganglionar de Naruke. De: The Japan Lung Cancer Society. Classification of Lung Cancer, 1st English Ed. Tokyo: Kanehara & Co., 2000.

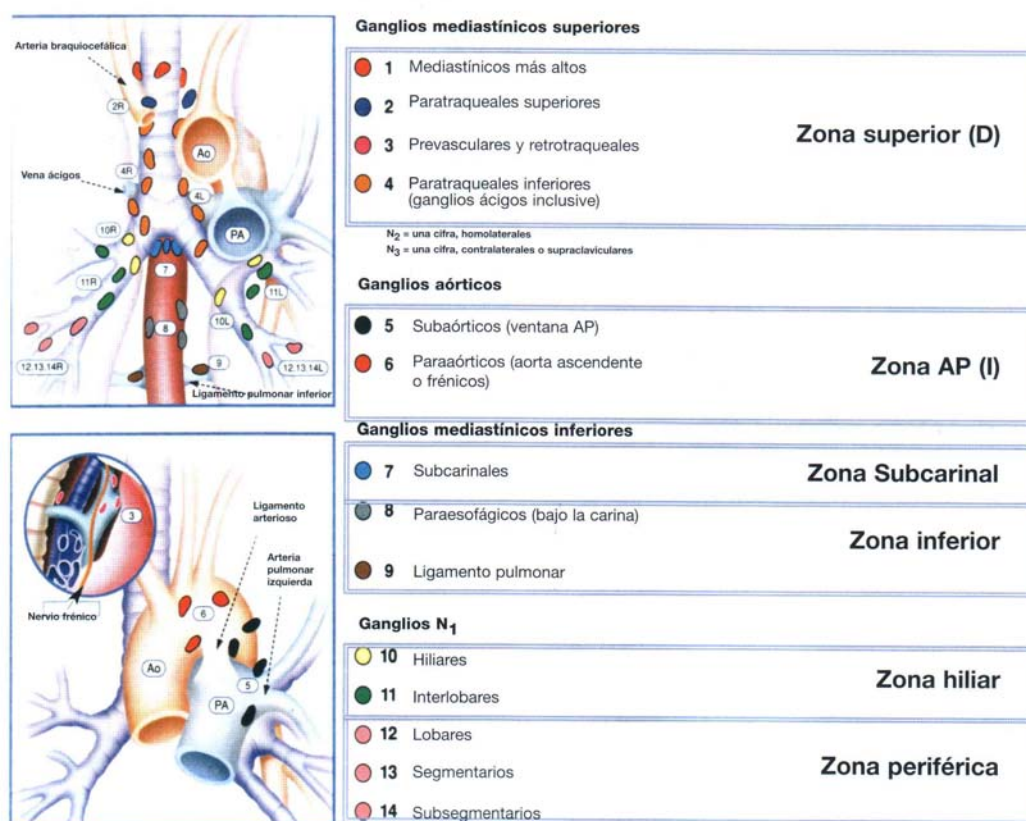


Figura 10.- Mapa ganglionar de Mountain-Dresler. De: Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. Chest 1997.

Tras la clasificación de Mountain de 1997 se diseñó en el seno de la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) un comité internacional de estadificación (ISC-IASLC) que se constituyó en 2001. Los resultados del estudio (100,101) han desencadenado una serie de modificaciones en la actual clasificación TNM y que, de acuerdo con la UICC y el AJCC, concluirá con una nueva clasificación TNM-estadios en el año 2009.

A.- La mayor parte de las recomendaciones afectan a la categoría T:

- 1.- Subclasificar T1 como T1a (≤ 2 cm.) ó T1b (> 2 cm. a ≤ 3 cm.).
- 2.- Subclasificar T2 como T2a (> 3 cm. a ≤ 5 cm. ó T2 por otro factor y ≤ 5 cm.) ó T2b (> 5 cm. a ≤ 7 cm.).
- 3.- Reclasificar los tumores T2 > 7 cm. como T3.
- 4.- Reclasificar los tumores T4 por nódulos adicionales en el pulmón homolateral (lóbulo del tumor primario) como T3.
- 5.- Reclasificar M1 por nódulo(s) adicional(es) en el pulmón homolateral (lóbulo distinto) como T4.
- 6.- Reclasificar la diseminación pleural (derrame pleural ó pericárdico neoplásico, nódulos pleurales) como M1.

B.- Consideraciones sobre la categoría N:

Se han planteado diferencias de supervivencia dentro de los grupos N1 y N2. Así, en pacientes sometidos a resección sin terapia de inducción se delimitaron varios grupos pronósticos: N1 en una zona, N1 en múltiples zonas ó enfermedad N2 en una y en

múltiples zonas. De todos modos, no hubo datos suficientes para determinar si debían subdividirse los descriptores N en: N1a, N1b, N2a y N2b.

C.- Recomendaciones en la categoría M:

- 1.- Subclasificar los derrames pleurales neoplásicos y los casos con nódulos en el pulmón contralateral en la categoría M1a.
- 2.- Subclasificar los casos con metástasis a distancia como M1b.
- 3.- Reclasificar los casos con nódulo(s) adicional(es) en el pulmón homolateral (lóbulo no primario) como T4.

D.- Modificaciones en los estadios tumorales:

- 1.- Se sugiere que los casos T2b N0 M0 pasen del estadio IB al IIA.
- 2.- Que los T2a N1 M0 pasen del estadio IIB al IIA.
- 3.- Que los casos T4 N0 M0 y T4 N1 M0 pase del estadio IIIB al estadio IIIA.

Dinámica de la clasificación tumoral:

La clasificación del cáncer de pulmón puede realizarse en diversos momentos de la evolución de la enfermedad y de la aplicación del tratamiento.

- Se denomina clasificación clínica (TNM ó TNMc) a la que se realiza antes del tratamiento. Se fundamenta en la información obtenida de la exploración física y de cualquier exploración complementaria, incluyendo las exploraciones quirúrgicas
- La clasificación que se realiza después del tratamiento quirúrgico, y que se basa en los datos de la clasificación clínica y en la evidencia obtenida del acto

quirúrgico y del estudio anatomopatológico de las piezas resecadas, se denomina clasificación patológica (TNMp). Es más precisa que la clasificación clínica y se ajusta más a la realidad de la extensión tumoral. Sirve para emitir un pronóstico y para decidir la idoneidad del tratamiento de consolidación. El factor Tp debe valorarse a partir de la resección del tumor primario ó, en su defecto, las biopsias obtenidas durante la intervención deben ser suficientes para establecer el Tp más alto. Para la valoración de la extensión ganglionar (Np), la extirpación ganglionar debe ser suficiente para establecer la ausencia de afectación (N0p) y para valorar el Np más alto. En el momento actual, para poder definir el estadio N0p, la UICC recomienda el estudio de al menos 6 ganglios hilio-mediastínicos (102). La definición de Mp requiere confirmación microscópica de las lesiones metastásicas.

- La clasificación durante ó después del tratamiento multimodal se designaron la letra y (TNMy). Permite conocer si ha habido algún cambio en la extensión tumoral adscrita en la clasificación clínica y decidir si el paciente puede ser sometido a tratamiento quirúrgico ó no.
- Otros momentos posibles de clasificación son: clasificación de tumores recidivados después de un intervalo libre de enfermedad, que se identifica con una r (TNMr); la clasificación de autopsia (TNMa) y la clasificación de tumores primarios múltiples (TNMm).

TRATAMIENTO

TRATAMIENTO QUIRÚRGICO:

1.- Introducción:

La cirugía continúa siendo el tratamiento más efectivo y potencialmente curativo para el cáncer pulmonar no microcítico. La resección completa es el objetivo principal de la cirugía, aunque lamentablemente sólo se puede conseguir en menos de un 25% de pacientes debido al diagnóstico tardío del tumor. La evaluación preoperatoria, especialmente la estadificación tumoral y el estudio de la función cardiorrespiratoria, es esencial para seleccionar al paciente, disminuir el riesgo de morbilidad peroperatoria y evitarle una toracotomía innecesaria. El tratamiento neoadyuvante con quimioterapia basada en cisplatino y otros nuevos fármacos, combinada ó no con radioterapia, ha conseguido mejorar la resecabilidad y la supervivencia de pacientes seleccionados en los estadios IIIA.

El tratamiento quirúrgico del carcinoma de pulmón fue abordado por primera vez el 18 de abril de 1932 en Michigan, en la 15ª Reunión Anual de la Asociación Americana de Cirugía Torácica, por Edwuard D. Churchil (103) cuando presentó su experiencia de cuatro pacientes. En 1933, Evarts A. Grahm realizó una neumonectomía, la cual, inició una nueva era en el tratamiento quirúrgico de estos tumores. La mediastinoscopia, introducida por Carlsens en 1959, y la tomografía computarizada, desarrollada en los años 1970 por Hounsfield y Cormack, fueron los grandes avances para el primer fin.

2.- Indicaciones quirúrgicas:

La resección quirúrgica está considerada como la mejor opción para el tratamiento del cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) cuando, en el momento del diagnóstico, la enfermedad está aún localizada y el paciente funcionalmente puede tolerar la cirugía.

En líneas generales (tabla III), se puede considerar que todos los pacientes del estadio I y casi todos los del estadio II son candidatos a resección pulmonar como tratamiento principal. Los pacientes del estadio IIIA y IIIB son candidatos a tratamiento multimodal y se valora la cirugía sólo en casos seleccionados. Para los pacientes del estadio IV está contraindicada la cirugía salvo en casos excepcionales.

Tabla III. Tratamiento del cáncer de pulmón.

Estadio	TNM	Tratamiento
IA	T1 N0 M0	Cirugía
IB	T2 N0 M0	Cirugía (¿ + tratamiento adyuvante?)
IIA	T1 N1 M0	
IIB	T2 N1 M0	
	T3 N0 M0	
IIIA	T3 N1 M0	Cirugía + tratamiento adyuvante N2: tratamiento neoadyuvante + cirugía
	T1-3 N2 M0	
IIIB	T4 N0-3 M0	QT RT (cirugía excepcionalmente)
	T1-4 N3 M0	
IV	T1-4 N1-3 M1	

Los tumores de clasificación T1 y T2 son adecuados para la extirpación total, ya sea por lobectomía ó por neumonectomía (104). Muchos tumores T3, por invasión directa de pericardio, la pleura parietal ó la pared torácica, pueden ser resecados totalmente en bloque. La invasión tumoral diafragmática directa es poco frecuente y, por sí sola, no es una contraindicación para la cirugía. Los tumores centrales, T3

localizados en el bronquio principal a menos de 2 cm. de la carina principal, T4 con invasión de la carina ó la pared traqueal, no son resecables por lo general. En condiciones ideales, pequeños tumores de estas características se pueden extirpar con técnicas de broncoplastia. La afectación del nervio frénico (T3) ó del nervio recurrente (T4) clásicamente contraindica cualquier cirugía, pero recientemente también se incluyen pacientes con esta afectación en algunos protocolos de tratamiento multimodal para la valoración quirúrgica. Otros tumores T4 con signos preoperatorios de invasión del corazón, de los grandes vasos, del esófago, de los cuerpos vertebrales ó los que se asocian con derrame pleural ó pericárdico maligno son considerados irresecables, a pesar de algunos éxitos ocasionales publicados en la literatura (105).

La metástasis ganglionar mediastínica, confirmada antes de la toracotomía, bien homolateral, N2; ó bien contralateral ó supraclavicular, N3; es signo de mal pronóstico y suele contraindicar la cirugía. Mientras que existe acuerdo casi unánime en que la lesión N3 y la N2 masiva (*bulky*) son contraindicaciones para la cirugía, el papel de la misma en la lesión N2 limitada sigue siendo objeto de controversias. La N2 clínica tiene una supervivencia global de sólo 2% y ésta se eleva al 9% en el grupo seleccionado para la cirugía. Los recientes estudios han demostrado que la quimioterapia preoperatoria puede conseguir una ventaja significativa de supervivencia en pacientes con tumores resecables en estadio IIIA. Actualmente la tendencia es incluir a pacientes con N2 clínica limitada y potencialmente resecable en un protocolo de quimioterapia de inducción y valorarlos después para la cirugía (106). Sin embargo, el diagnóstico de N2 clínica en estos casos no debe basarse sólo en el tamaño radiológico de los ganglios mediastínicos.

La detección en el preoperatorio de metástasis múltiples supone una contraindicación absoluta para la cirugía pulmonar. En casos muy excepcionales de metástasis cerebral única asociada con un CPNM completamente resecables, se puede contemplar la cirugía para ambas lesiones combinada con radioterapia craneal después de un estudio de extensión amplio. También se han publicado series retrospectivas de tratamiento quirúrgico de cáncer pulmonar primario con metástasis suprarrenal solitaria. Los pocos casos seleccionados tienen una supervivencia media de 24 meses.

3.- Papel de la cirugía en el tratamiento multimodal:

La cirugía constituye el eje principal del tratamiento del CPNM, sin embargo menos del 25% de estos tumores se presentan como lesión localizada y son adecuados para una resección completa, e incluso en la mitad de estos casos, la mitad de los pacientes perecerán por recidiva de su enfermedad. Más del 75% de estas recidivas ocurren como metástasis a distancia lo que implica que la inmensa mayoría de los CPNM en el momento del diagnóstico ya son enfermedad generalizada. Alrededor de un 40% de los CPNM son localmente avanzados, en estadio IIIA ó IIIB, que son tumores generalmente no resecables ó en los que la cirugía servirá de poco (5-13%). Es evidente que las terapias locales solas, como la cirugía, no son suficientes para el control de esta enfermedad y una terapia sistémica efectiva debe formar parte del tratamiento (107, 108).

En los últimos años nuevos regímenes de quimioterapia (QT), especialmente basados en cisplatino (QTBC), han logrado mejores respuestas tumorales y mayor supervivencia de los pacientes. Para los CPNM de estados precoces, I y II, un metaanálisis demuestra que la QTBC adyuvante puede aumentar en un 5% la

supervivencia. Otros estudios de QT adyuvante, que incluyen CPNM de estadio III, mejoran la supervivencia utilizando tegafuro y uracilo (UFT) por vía oral durante más de 6 meses. Para los tumores localmente avanzados, de estadios IIIA y IIIB, los resultados de numerosos ensayos clínicos de fase II de QT de inducción con ó sin radioterapia (RT) seguida de cirugía sugieren que la terapia bi ó trimodal puede mejorar la resecabilidad y obtener mejoras de supervivencia en pacientes seleccionados (109). Los ensayos randomizados de fase III (105) en tumores resecables de estadio IIIA también demuestran que la QT de inducción consigue mayor supervivencia.

4- Morbimortalidad postoperatoria:

En general las complicaciones más habituales suelen ser las respiratorias (fracaso respiratorio agudo, atelectasia y neumonía), seguidas de aquellas que están en relación con la técnica ó acto quirúrgico (fuga aérea persistente, enfisema subcutáneo, empiema postquirúrgico, fístula bronquial, hemotórax, infección de la herida quirúrgica, quilotórax y síndrome postneumonectomía). Las complicaciones de tipo cardiovascular se observan en menor medida, aunque la alteración del ritmo cardíaco como complicación específica es de las más frecuentes, seguida de embolismo pulmonar y edema agudo de pulmón.

Si consideramos todo tipo de exéresis, la mortalidad media se suele situar alrededor del 3,5% con extremos que se sitúan entre el 1 y el 11% (110). Es evidente que existe una amplia dispersión en cuanto a dichos resultados, que parece estar en relación con tres aspectos perfectamente diferenciados: comorbilidad previa ó concomitante, tipo de resección y origen de la muestra objeto del estudio.

QUIMIOTERAPIA Y RADIOTERAPIA:

Desde hace varias décadas quedó establecida la eficacia de la quimioterapia (QT) ó poliquimioterapia (PQT) y de la radioterapia (RT) en el cáncer microcítico de pulmón (CPM). Por el contrario, el papel de la PQT ha sido largamente controvertida en el cáncer no microcítico (CPNM), y sólo hace pocos años se ha demostrado su eficacia en cuanto a aumento de la supervivencia y de la calidad de vida.

Tratamiento del carcinoma no microcítico de pulmón:

En este apartado se incluyen sólo a los pacientes que han sido considerados no subsidiarios de tratamiento quirúrgico por iresecabilidad del tumor (estadios IV, IIIB y algunos IIIA) ó por inoperabilidad debido a la coexistencia de otras enfermedades.

En general, los pacientes con estadio III y sin derrame pleural serán candidatos a tratamiento combinado (QT más RT), y los que muestren metástasis a distancia y/ó derrame pleural, ó bien presenten alguna contraindicación específica para recibir RT, podrán ser candidatos para recibir poliquimioterapia (PQT) aislada.

a.- Tratamiento combinado:

Es posible identificar pacientes cuyas mejores expectativas de supervivencia, les hace candidatos ha ser incluidos en protocolos terapéuticos que combinen RT y QT. El grupo cooperativo Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) ha analizado aquellos factores clínicos que en el CPNM localmente avanzado permiten identificar a grupos de pacientes con diferente pronóstico (111). La QT y la RT pueden administrarse de forma secuencial (habitualmente los citostáticos primero y después la irradiación) ó de manera simultánea.

Eficacia terapéutica: aunque parece establecido que los tratamientos combinados consiguen aumentar la supervivencia en pacientes seleccionados con CPNM localmente avanzado, se ha cuestionado que dicho beneficio se mantenga a largo plazo. Además, nuevos estudios fase III ratifican que la combinación es superior a la irradiación ó a la QT aisladas. Toxicidad: la combinación de modalidades terapéuticas incrementa la toxicidad aguda y crónica lo que puede contrarrestar la ganancia terapéutica por la necesidad de disminuir la intensidad de dosis ó de prolongar los tratamientos. (109).

b.- Tratamiento con poliquimioterapia:

En principio pueden ser subsidiarios de tratamiento con PQT aislada los pacientes con estadio IV y IIIB por derrame pleural, además de aquellos con estadios inferiores de la clasificación TNM que presenten alguna contraindicación para recibir RT ó cirugía. En cuanto a las contraindicaciones, aunque no hay pruebas suficientes al respecto, en general no se recomienda el uso de PQT en caso de mal *performance status* : parece clara su inutilidad en caso de grado ECOG >2, e incluso con ECOG de 2 la eficacia es dudosa.

La presencia de metástasis cerebrales sintomáticas, la coexistencia de otras enfermedades importantes (EPOC, insuficiencia respiratoria, patología cardíaca,...) y, en menor grado, la edad avanzada (mayor de 75 años) son circunstancias que disminuyen la probabilidad de obtener algún beneficio y aumentan la de la aparición de efectos tóxicos de la PQT, por lo que habrán de considerarse especialmente en la toma de decisiones.

Se disponen de varios fármacos que han demostrado su eficacia frente al CPNM, como los derivados de platino (cisplatino y carboplatino), los taxanos (placitaxel y docetaxel), vinorelbina, gemcitabina ó las camptecinas (topotecán e irinotecán).

Resultados: en pacientes con CPNM metastático ó con derrame pleural, incluso aunque se obtenga una respuesta favorable, la supervivencia a largo plazo es prácticamente nula. Las modestas ventajas son apreciables sólo a corto plazo. Actualmente, la mediana varía ligeramente alrededor de 8 meses, y el porcentaje de supervivencia a los 5 años se encuentra entre el 0-1% (112).

NUEVAS ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS:

El desarrollo de la biología molecular ha supuesto un gran avance en el conocimiento de la función celular. Se ha demostrado que la proliferación y crecimiento celular están regulados por un ajustado equilibrio entre factores estimuladores e inhibidores y que la pérdida del mismo conlleva un crecimiento celular incontrolado y al desarrollo del cáncer.

Así se han desarrollado fármacos que intentan conseguir ese equilibrio (113):

- Inhibidores de la señal de transducción.
- Inhibidores de la angiogénesis.
- Tratamientos que bloquean el receptor del factor de crecimiento epidérmico.

También se han diseñado vacunas para el cáncer de pulmón. Su objetivo es incrementar la respuesta celular inmune y prolongar la supervivencia.

SUPERVIVENCIA:

El pronóstico para los pacientes con carcinoma de pulmón sigue siendo pobre. El factor pronóstico más importante para el tratamiento del paciente con cáncer de pulmón es el estadio de presentación de la enfermedad, seguido del tipo histológico, el sexo y la edad.

Hay que diferenciar entre el estadio clínico y el patológico; así, la supervivencia a los 5 años para el carcinoma no microcítico de pulmón se describe en la tabla IV (114):

Tabla IV. Supervivencia por estadios clínicos y patológicos del carcinoma no microcítico de pulmón.

ESTADIO	CLÍNICO (%)	PATOLÓGICO (%)
IA	77,3	83,9
IB	59,8	66,3
IIA	54,1	61,0
IIB	43,9	47,4
IIIA	38,3	32,8
IIIB	32,6	29,6
IV	26,5	23,1

I.2.- BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN

MARCADORES TUMORALES:

CONCEPTO:

Un marcador tumoral (MT) es aquella sustancia producida ó inducida por la célula neoplásica que refleja su crecimiento y/ó su actividad y por ello permite conocer la presencia, evolución ó respuesta terapéutica de un tumor maligno. Teóricamente, el marcador ideal sería aquel cuya presencia indicase siempre la existencia de un tumor maligno (especificidad 100%) y que al mismo tiempo fuese detectable siempre que esté presente una neoplasia (sensibilidad 100%). Por otra parte a este marcador ideal habría que exigirle otra condición: que sea fácilmente detectable, ya que una sustancia presente sólo en tejido tumoral sólo es cuantificable cuando previamente se ha diagnosticado y abordado esta neoplasia.

En la actualidad no disponemos de este marcador ideal, y la tendencia actual va dirigida al estudio de una batería de marcadores, con diferentes sensibilidades y especificidades, cuya combinación se acerca lo más posible al concepto de marcador ideal, con determinaciones seriadas para evaluar en cada paciente las oscilaciones durante el diagnóstico, tratamiento y seguimiento de la neoplasia.

Hay que considerar también que la gran mayoría de los marcadores no son sintetizados en exclusividad por la célula neoplásica sino que podemos detectar elevaciones en el transcurso de determinadas patologías benignas, que han de ser descartadas durante el diagnóstico en estos pacientes. Las sustancias consideradas como marcadores son sintetizadas, liberadas ó inducidas por la célula neoplásica y sus determinaciones se realizan generalmente en sangre periférica. Así pues, los niveles alcanzados dependen de:

1.- El número de células productoras: cuanto mayor sea la subpoblación de células tumorales productoras, mayor será la síntesis de estas sustancias. Esto hace que en muchos casos exista relación directa entre el tamaño de la tumoración y el valor del MT.

2.- La vascularización tumoral: el MT una vez sintetizado pasa a sangre periférica y por tanto se detecta mejor en aquellos casos en que la neoplasia está muy vascularizada ó su acceso vascular es bueno.

3.- La biología tumoral: aquí intervienen factores como la velocidad de crecimiento tumoral, la diferenciación, etc. Hay MT relacionados con la duplicación celular, otros se liberan durante la necrosis. Por tanto se detectan valores elevados de estos MT en tumores con gran rapidez de crecimiento y de necrosis.

4.- El metabolismo del MT: hay tejidos y estirpes celulares que producen estas sustancias en condiciones normales con ausencia de degeneración neoplásica, por lo tanto se ha de conocer y descartar la patología benigna que puede cursar con elevación del MT. Además hay que evaluar la función renal cuando se trata de un MT que se elimina por esta vía, ó la función hepática en su caso.

5.- La vida media plasmática: es muy variable, oscilando entre varias horas y varios días, dato que hay que tener en cuenta a la hora de evaluar la respuesta a un tratamiento como el quirúrgico.

La primera sustancia química identificada por el laboratorio, a la que se puede considerar marcador tumoral, data de 1846 con el descubrimiento por Bence-Jones de un precipitado en la orina de un paciente con la enfermedad ósea hoy conocida como mieloma, inmunoglobulina del mieloma en suero, se usa para controlar los efectos del tratamiento y refleja la cantidad de masa tumoral. En 1928, Brown publica el caso de una paciente con cáncer de pulmón de células de avena, asociado a hipercortisolismo

suprarrenal lo que constituye la primera descripción de una secreción hormonal ectópica relacionada con el cáncer. En 1936, Gutman y cols (115) descubren el aumento de la hidrólisis enzimática de los fosfatos orgánicos a pH ácido en el suero de pacientes con cáncer de próstata. En 1942, Zondek (116) informa sobre la asociación entre las hormonas gonadotropina coriónica y el coriocarcinoma gestacional. En 1957, Björklund describe el antígeno polipeptídico tisular (TPA) a partir de una mezcla de tejidos tumorales de distintos órganos. Es en la década de los 60, con el descubrimiento de las proteínas oncofetales, cuando surge el interés actual por los marcadores tumorales y se describen los primeros marcadores no endocrinológicos. En 1963 Abelev describe la AFP (alfa-fetoproteína) y su relación con el hepatocarcinoma. En 1965 es descubierto el antígeno carcinoembrionario (CEA) por Gold y Freedman (117), que demostraron que es un antígeno específico de adenocarcinomas del tracto digestivo, presente también en los tejidos endodérmicos durante los dos primeros trimestres del desarrollo embrionario y fetal. Es a partir de 1975 con el descubrimiento de los anticuerpos monoclonales por Köhler y Milstein (118), cuando se consiguen nuevos avances; con esta tecnología es posible contar con antígenos específicos de un tipo histológico y de ciertos estadios de diferenciación celular ó tisular, que tienen una traducción clínica real.

CLASIFICACIÓN:

A.- Según su especificidad se pueden dividir los marcadores tumorales en:

I.-Marcadores Tumorales de Alta Especificidad:

Son aquellos marcadores que, aunque también pueden elevarse en patologías benignas, alcanzan niveles claramente más altos en las neoplasias. Suelen tener una

elevada sensibilidad, relacionada con tipos específicos de neoplasias. En este grupo encontramos: B-H.C.G, Calcitonina y B-Glicoproteína asociada al embarazo (S.P.-1).

II.-Marcadores Tumorales de Especificidad Intermedia:

Se detectan a bajas concentraciones en individuos sanos, y elevaciones variables en patologías neoplásicas. Aquí están incluidos la mayoría de los M.T. Suelen tener una sensibilidad también intermedia, y son las determinaciones seriadas las que pueden proporcionar mejores datos, con aumentos progresivos en las patologías neoplásicas y estabilización en procesos benignos.

III.-Marcadores Tumorales de Baja Especificidad:

Son aquellos que tienen interés en el control evolutivo de los pacientes con neoplasias, pero que no presentan diferencias significativas comparadas con los niveles que alcanzan en personas sanas. A este grupo pertenecen diversas enzimas glicolíticas como la F.H.I. (Fosfohexosa Isomerasa) ó la G.G.T. (Gammaglutamil transpeptidasa).

B.- Por su naturaleza se clasifican en dos grupos (tabla V):

I.- Marcadores derivados del tumor:

Son aquellos producidos por la célula neoplásica.

II.- Marcadores asociados al tumor:

Los producidos como respuesta del huésped.

III.- Otros marcadores.

Tabla V. Clasificación de los marcadores tumorales por su naturaleza.

MARCADORES DERIVADOS DEL TUMOR		
MARCADORES DE SECRECIÓN	Antígenos oncofetales	AFP CEA
	Hormonas	BHCG ADH PTH Calcitonina Catecolaminas
	Enzimas	PHI PAP NSE
	Proteínas específicas	TA-4 SCC TPA PSA Inmunoglobulinas
	Mucinas y otras Glicoproteínas	CA12.5 CA19.9 CA50 CA15.3
MARCADORES TISULARES	Oncogenes y Derivados	N-mic H-Ras
MARCADORES ASOCIADOS AL TUMOR	Ferritina Proteínas de fase aguda TNF	
OTROS MARCADORES	Cobre Zinc	

I.- MARCADORES DERIVADOS DEL TUMOR:**MARCADORES DE SECRECIÓN:****a.- ANTÍGENOS ONCOFETALES:****1.- Alfafetoproteína:**

Es una glicoproteína sérica compuesta por una cadena polipeptídica y un 4% de carbohidratos, similar en estructura, tamaño y composición de A.A. a la albúmina, con un peso molecular de aproximadamente 70.000 Dalton. Está presente en el suero en elevadas concentraciones antes del nacimiento, para ir desapareciendo posteriormente. Alcanza un pico máximo en la semana 13-14 en sangre fetal, elevándose también en la gestante aunque de forma más transitoria. Su vida media sérica es de 3,5 a 6 días. Fue descubierta por electroforesis en 1957 en sangre de cordón umbilical del recién nacido por Bregstrand y Czar quienes la llamaron "Componente X". Posteriormente en 1965 Tatarinov la detectó por primera vez en suero de un paciente con carcinoma hepatocelular. Desde entonces se ha demostrado que la elevación de la AFP por encima de determinados valores ocurre en diversas enfermedades malignas (119,120) y han sido descritas posteriormente elevaciones de este marcador en otros tipos tumorales como en el cáncer de pulmón.

2.- Antígeno carcinoembrionario (CEA):

Descubierto en 1965 por Gold y Fredman en tejido de tumores de colon. Es una glicoproteína que contiene N-Acetil Glucosamina con un peso molecular de 200.000 Dalton aproximadamente. Posee determinante antigénico A.C.E. y del grupo sanguíneo A. En su estructura, el 40% es de naturaleza polipeptídica y el 60% restante de hidratos de carbono, uno de los cuales, el ácido siálico, es el responsable de la heterogeneidad del

marcador en función a su concentración. Según datos recientes el CEA es solo uno de los componentes de una familia de moléculas que comparten determinantes antigénicos. Entre otras proteínas de esta familia se incluyen la NCA (Nonspecific Crossreaction Antigen) presente en pulmón, granulocitos y células epiteliales. Recientemente se han aclarado las diferencias genéticas y de secuencia peptídica entre CEA y la NCA, lo que ha permitido desarrollar técnicas de detección más específicas al eliminar falsos positivos originados por epítomos comunes. Se ha comprobado que el CEA se relaciona con las inmunoglobulinas y que es una molécula fijada a la membrana celular, lo que plantea la posibilidad de que su concentración en suero no solo refleje la masa tumoral, sino también la actividad proliferativa. Así mismo, por pertenecer a la familia de proteínas de membrana, interviene en la adhesividad celular.

Está normalmente presente en la célula de la mucosa intestinal durante la vida fetal. Inicialmente fue considerado un marcador específico de los tumores del aparato digestivo, en particular del colon (121), pero posteriormente se ha comprobado que está presente también en el suero de pacientes portadores de otras neoplasias como las de mama, páncreas, pulmón y ovario. Aumenta también en enfermedades no neoplásicas como las enfermedades inflamatorias del intestino (Enfermedad de Crohn, Colitis Ulcerosa), en el 50% de las pancreatitis, y en el 20-40% de las colecistitis sin colangitis. Se encuentra elevada en tumores de origen endodérmico aunque su elevación no es precoz y por ello no es útil en programas de despistaje.

Pertenece al grupo de sensibilidad y especificidad intermedia, y en el caso que nos ocupa, el cáncer de pulmón, puede tener una alta incidencia de falsos positivos.

Es especialmente útil para el seguimiento de los pacientes (122): control postoperatorio, respuesta a la quimioterapia (123,124) y ha sido descrito también como

factor pronóstico (125). Asociado a otros parámetros clínicos y de laboratorio ha sido utilizado en la determinación de presencia de metástasis (126). Finalmente se utiliza en el diagnóstico diferencial de los derrames pleurales benignos-malignos, midiendo su concentración en líquido pleural. Se ha demostrado que niveles superiores a 5 ng/ml tienen una especificidad del 98% y sensibilidad del 53% para diferenciar el derrame pleural neoplásico (127).

Con respecto a sus niveles séricos, los resultados varían según el dintel que se considera, así encontramos para este marcador una sensibilidad que varía entre el 45% (128), el 47,6% y el 58,3%, oscilando en general entre el 30 y 80% para valores superiores a 2,5 ng/ml. Considerando como normales valores inferiores a 2,5 ng/ml ha sido descrita una sensibilidad del 51% con una especificidad del 72% (129). Estos mismos autores tuvieron que elevar los valores de la normalidad a 5 y 10 ng/ml para obtener una especificidad 92 y 99% respectivamente, con lo cual la sensibilidad descendió a 32 y 18%.

Algunos autores no encuentran diferencias significativas en el nivel sérico de CEA al comparar entre sí los diferentes tipos histológicos de cáncer de pulmón, frente a otros autores que presentan niveles significativamente mayores en el adenocarcinoma y en el de células grandes (130). Igualmente hay estudios que no encuentran relación entre los niveles séricos de CEA y el tamaño del tumor, el lugar de las metástasis ó el número de órganos afectados, en oposición a otros autores que sí presentan resultados con valores séricos aumentados en la enfermedad extendida (129,131,132) respecto a la enfermedad localizada (133). Cuando la concentración media de CEA elevada también se relaciona con peor pronóstico en pacientes con estadio tumoral precoz. A pesar de todo esto, hasta ahora, el CEA sigue sin tener un valor predictivo significativo para el paciente individualizado.

b.- HORMONAS:

Existen tumores que producen diferentes hormonas: catecolaminas, calcitonina, PTH,..., y que se pueden ayudar a su diagnóstico.

c.- ENZIMAS:**1.- Fosfohexosa isomerasa:**

Es una enzima glicolítica que cataliza de forma reversible, el paso de Glucosa-6P hacia Fructosa-6P. Fue determinada en primer lugar por Bodansky en 1954, localizada en hígado, músculo esquelético, hueso, cerebro y pulmón, así como en suero de pacientes con enfermedades malignas. La elevación de esta enzima en el suero de pacientes con cáncer de pulmón ha sido demostrada por muchos autores desde West en 1962, Schwartz en 1985 ó Asseo en 1988 (134). Se han descrito niveles elevados en el 72% de los casos, con elevaciones menores en pacientes sin metástasis y mayores en los que presentaban metástasis hepáticas. Schwartz describe niveles elevados de P.H.I. en estadios localizados del SCLC y sugiere por tanto que puede ser utilizada como marcador precoz.

En el cáncer de pulmón su nivel sérico pretratamiento tiene significación pronóstica en algunas series consultadas, independientemente del tipo histológico ó del estadio de la enfermedad. Se han encontrado elevaciones séricas estadísticamente significativas en el cáncer de pulmón de células pequeñas y en el de células grandes respecto al epidermoide ó al adenocarcinoma (135), sin embargo otros autores no encuentran estas diferencias al comparar SCLC y NSCLC (136). Tomando como referencia 120 U/ml se han publicado estudios con un valor sérico elevado en el 90% de los casos.

2.- Enolasa:

La Enolasa (2-fosfo-D-glicerato-hidrolasa) es una enzima glucolítica que cataliza la conversión del 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato y que existe en forma de dímero isoenzimático con un peso molecular de unos 80.000 dalton. Estos dímeros son combinaciones de tres subunidades inmunológicamente distintas: alfa, beta y gamma (137). La subunidad gamma de Enolasa humana se ha encontrado a elevadas concentraciones en las neuronas y células neuroendocrinas y ha sido denominada por tanto "Enolasa Neurono-específica" (NSE). La subunidad alfa se ha encontrado en los tejidos de los mamíferos y en las células gliales del cerebro (138), mientras que la subunidad beta se localiza especialmente en los músculos esqueléticos y en el tejido miocárdico. Su valor normal puede llegar a 15 ng/ml.

Los niveles séricos se encuentran elevados en pacientes con Neuroblastomas, Melanomas, Hipernefomas y sobre todo en el cáncer de pulmón de células pequeñas (139) y en tumores carcinoides aunque no es absolutamente específico de enfermedad maligna. Esta enzima glicolítica contenida en las células neuroendocrinas del sistema APUD, ha sido identificada en tumores neuroendocrinos incluyendo el carcinoma pulmonar microcítico en el cual se ha determinado un nivel sérico elevado desde el 69% de todos los pacientes hasta el 90% (139), oscilando entre el 39% en estadios precoces y el 87% en enfermedad avanzada (136). Los niveles regresan a la normalidad en todos los pacientes que presentan remisión completa y están significativamente elevados en enfermedad extendida respecto a enfermedad localizada (140). Se ha presentado una correlación directa entre la elevación de esta enzima y el estadio clínico en pacientes con carcinoma pulmonar de células pequeñas sometidos a tratamiento, observando un 0% en los pacientes con remisión completa, un 16% con la enfermedad estabilizada y un 73% en pacientes con

progresión aunque otros autores no utilizan directamente los valores séricos de Enolasa sino el cociente entre la Enolasa Neurono-específica y la no Neurono-específica. Los niveles de Enolasa proporcionan por tanto información en el carcinoma microcítico sobre el estadio, la evolución de la enfermedad y la respuesta al tratamiento (141), y algunos autores presentan sus niveles pretratamiento como factor pronóstico.

Sin embargo no sólo aumenta esta enzima en tumores neuroendocrinos sino que se han descrito incrementos en el 18% de los pacientes con cáncer de pulmón no microcítico. Esto se explica porque algunos tumores expresan en diferentes zonas características histológicas tanto de epidermoide como de adenocarcinoma ó de células grandes ó pequeñas.

d.- PROTEÍNAS:

1.- TA-4 (Tumor-Antigen 4):

Es una fracción proteica de Pm aproximado de 48.000 Dalton que se extrae y purifica del carcinoma de células escamosas del cérvix uterino y que puede ser determinado mediante radioinmunoanálisis en sus determinaciones séricas.

Está considerado un buen marcador en este tipo de tumores escamosos en general, especialmente para evaluar los efectos de la terapéutica y monitorizar la recurrencia. Otros autores (142) demuestran que sus niveles séricos se correlacionan con la progresión y la regresión del carcinoma epidermoide de pulmón.

2.- SCC (Squamous cell carcinoma):

Es una fracción purificada del antígeno tumoral Ta-4 descrito por primera vez por Kato y Torigoe en el carcinoma de células escamosas del cérvix uterino (143). El Ta-4 es

una proteína con un peso molecular aproximado de 48.000 Dalton, que se puede dividir en 14 fracciones, una de las cuales es el SCC. Estos autores han desarrollado un método de radioinmunoanálisis con anticuerpos monoclonales para detectar los valores séricos de este marcador. Sus primeros estudios demostraron niveles elevados en pacientes con carcinoma de células escamosas de cérvix, aunque posteriormente se ha demostrado la presencia de SCC en el epitelio escamoso normal y en tumores benignos de origen epitelial (144). Hay factores extratumorales que pueden influir en el nivel sérico de este marcador como es la presencia de fallo renal que se asocia con más frecuencia a niveles altos de SCC y la concentración de creatinina sérica, que aunque no se relaciona estadísticamente con el nivel de SCC, si que presenta este marcador un aumento proporcional con el grado de insuficiencia renal. El rango normal del valor sérico de SCC en individuos sanos es inferior a 2.5 ng/ml. Se ha presentado una especificidad del SCC que oscila entre el 71 y el 91% cuando se excluyen los pacientes con fallo renal ó los que presentan valores altos de creatinina en suero (145) y una sensibilidad del 77%.

Existen otras enfermedades benignas que presentan un valor aumentado de SCC como son las enfermedades benignas del pulmón y los tumores benignos del corazón en los cuales se encuentran valores aumentados hasta en un 40% de los pacientes, aunque ninguno de ellos, si excluimos el fallo renal, superan el valor de 5 ng/ml. Aunque se pueden encontrar valores elevados en estas patologías benignas tanto de SCC como de otros marcadores como el CEA, la ventaja adicional observada para el SCC es que este no se modifica con el hábito de fumar (146).

El SCC puede ser utilizado como ayuda en la clasificación de los tumores de pulmón, particularmente para distinguir el de células pequeñas del carcinoma broncogénico de células no pequeñas y diagnosticar el subtipo de células escamosas. Se ha

especulado que la elevación del SCC en otros tipos de cáncer de pulmón es una consecuencia de la heterogeneidad del tumor y puede indicar una diferenciación de células escamosas parcial. Así pues, se trata de un marcador tumoral que aumenta en el carcinoma de células escamosas, con un incremento en tumores no epidermoides de sólo el 9,3% en contraste con el 57,7% en tumores de estirpe epitelial y que puede ser utilizado para monitorizar la eficacia del tratamiento en el carcinoma epidermoide de pulmón.

La elevación de este marcador no depende de la extensión de la enfermedad sino más bien de propiedades intrínsecas a la propia célula neoplásica aunque en general su elevación constituye un factor de pronóstico adverso (147).

3.- TPA (Antígeno polipeptídico tisular):

Se trata de una sustancia bien definida químicamente, producida y liberada por células en proliferación, que se detecta en suero de pacientes con gran variedad de procesos neoplásicos incluyendo el cáncer de pulmón (148).

En esta patología ha sido utilizado para evaluar la enfermedad extendida, monitorizar la evolución clínica y como factor pronóstico. Los niveles séricos pretratamiento de TPA se relacionan directamente con la extensión de la enfermedad según la clasificación TNM (149) y por tanto proporcionan información con carácter pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón. En oposición a esto, otros autores (150) no encuentran relación entre los niveles séricos de TPA y el estadio clínico, indicando el valor limitado de este marcador en el cáncer de pulmón. Para este marcador tumoral ha sido descrita una sensibilidad del 85% con una especificidad superior al 90% (151).

e.- MUCINAS Y OTRAS GLICOPROTEÍNAS:

Las glicoproteínas mucinosas son moléculas de alto peso molecular (Pm), presentes como antígenos de superficie celular, compuestas por una cadena polipeptídica unida a oligosacáridos vía O-glicosídica, en contraste con la unión N-glicosídica de las glicoproteínas AFP y CEA. El grupo sanguíneo antigénico Lewis es el representativo de este tipo de moléculas. El contenido en carbohidratos de este tipo de glicoproteínas es del 60-80%.

Las células presentes en los epitelios de superficie expresan glicoproteínas mucinosas. Las células neoplásicas pueden tener alterado el sistema enzimático de la glicosiltransferasa ó glicosidasa dando lugar a variaciones en la glicosilación que pueden poner de manifiesto epítomos previamente inaccesibles y por lo tanto dar lugar a variaciones en los antígenos de superficie celular. El significado de estos cambios en el comportamiento del tumor no está todavía bien aclarado, pero permite diferenciar entre células normales y células tumorales utilizando anticuerpos monoclonales.

1.- Carbohidrato antígeno circulante 12.5 (CA 12.5):

Descubierto por Bast en 1983. El CA 12.5 es un epítomo carbohidratado de un antígeno glicoproteico identificado inicialmente en la línea celular OVCA 433 procedente de un carcinoma seroso de ovario y reconocido por el anticuerpo monoclonal OC 12.5 (152). Este antígeno está presente en las estructuras derivadas del epitelio fetal celómico: peritoneo, pleura y pericardio. Su principal campo de aplicación ha sido hasta ahora en el diagnóstico y seguimiento de los tumores de ovario, donde alcanza una sensibilidad y especificidad superiores al 90% (153). Un aspecto destacado del CA 12.5 es su elevada especificidad, ya que menos de 1 % de los sujetos sanos presentan concentraciones

elevadas de suero (154,155,156). Los "cut-off" empleados habitualmente oscilan entre 15 y 35 U/ml, según autores y técnica analítica utilizada por inmunoanálisis ó radio inmunoanálisis respectivamente.

Las secreciones bronquiales en condiciones normales contienen una elevada concentración de CA 12.5 (590-4803 U/mg de proteína) y este antígeno se puede detectar por inmunohistoquímica en las células del epitelio bronquial de sujetos sanos (157). Menos del 10% de los pacientes con patología pulmonar benigna presentan niveles séricos elevados (154,155). En el CPNM presenta una sensibilidad baja (44 %) (158,159), aunque los valores predictivos positivo y negativo están próximos al 100%. El CA 12.5 refleja correctamente la masa tumoral en el CPNM, de forma que la concentración en suero y el tanto por ciento de pacientes con valores pretratamiento patológicos están directamente relacionados con el estadio TNM: 25% en I, 38% en II, 45% en IIIa, 54% en IIIb y 100% en IV. También es interesante la relación que presenta este marcador con el carcinoma de células grandes, pues el 90% de los pacientes presentan concentraciones séricas elevadas y el 100% poseen altos niveles de este marcador en el citosol tumoral (160). Dicha observación es importante si tenemos en cuenta las dificultades de diagnóstico de este tipo histológico. También se encuentran niveles elevados en citosol en adenocarcinomas (161).

El antígeno CA 12.5 constituye un factor predictivo muy destacado para identificar, dentro del grupo de pacientes en estadio I, II y IIIA, el subgrupo de sujetos de alto riesgo (154,159). A igualdad de otros factores pronóstico, los pacientes con niveles séricos elevados poseen menor índice de supervivencia y mayor probabilidad de desarrollar recidivas y metástasis (162).

Su valor como test de seguimiento postoperatorio es moderado, la sensibilidad para la detección de recidivas es 50%, aunque mejora significativamente al considerar

únicamente los pacientes con valores preoperatorios elevados. No está claro la relación con el grado de quimiosensibilidad de los pacientes que presentan niveles elevados de este antígeno, lo que sería útil para monitorizar la respuesta clínica en pacientes sometidos a tratamiento citostático y para seleccionar tratamiento adyuvante, aunque existen trabajos en esa línea (163,164).

2.- Antígeno de la carbohidrasa 19.9 (CA 19.9):

Descubierto por Koprowsky en 1979. Es un monosidogangliósido del Epítipo Lewisa que se detecta mediante un anticuerpo monoclonal frente a este antígeno carbohidratado (salicilato lacto-N-fucopentosa) y cuyo nivel sérico se encuentra elevado en pacientes con neoplasias (165) y en enfermedades no malignas de pulmón (166). Su valor normal puede llegar a 25 U/ml.

Se encuentra elevado en el 24% de los adenocarcinomas, 19% del CPM y 15% del epidermoide. Por otra parte tomando como referencia un valor de 36 U/ml se han descrito aumentos séricos que oscilan entre el 21% de pacientes con carcinoma de pulmón, el 11% y el 10% alcanzando una especificidad superior al 90%. Podemos encontrar además valores elevados en tumores pancreático-biliares y en enfermedades inflamatorias. Existen otros marcadores tumorales derivados del CA 19.9, como son el Sialosylated Lewisa (S-Lea) y el Sialoylated Lewix (S-Lex). Ambos son determinantes antigénicos activos del CA 19.9, siendo entre sí isómeros posicionales. Además de su utilidad en el seguimiento de la respuesta terapéutica, ha sido correlacionado el nivel sérico de este marcador con la supervivencia del paciente y con la resecabilidad del tumor.

3.- Antígeno carbohidrato circulante CA 50 (CA 50):

Descubierto en 1984 por Holmgren. El epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal CA 50 está presente en dos estructuras carbohidratadas diferentes: el Sialylated Lewis y el Sialylated lacto-N-tetraose. Este antígeno CA 50 se encuentra formando parte de los gangliósidos de la membrana celular. Su valor normal puede llegar a 16 U/ml. Se encuentra elevado en el 40.6% de las neoplasias de pulmón, y al igual que los otros marcadores, no es específico de órgano. También se ha correlacionado con la supervivencia del paciente afecto de cáncer de pulmón (167).

II.- MARCADORES ASOCIADOS AL TUMOR (RESPUESTA DEL HUÉSPED):

II.1.- FERRITINA (FERR):

Es una proteína del metabolismo del hierro. En el adulto el hierro se almacena en forma de ferritina (Fracción Soluble) ó de hemosiderina (Agregado Insoluble). Los niveles de Ferritina pueden aumentar independientemente de los niveles de hierro en estados febriles ó inflamatorios, hepatopatías, etc...

En las patologías neoplásicas puede aumentar por:

- Síntesis de ferritina en la célula neoplásica.
- Liberación de ferritina por las células lesionadas.
- Fenómenos inflamatorios asociados a la neoplasia.

En el cáncer de pulmón se ha encontrado una sensibilidad del 45%, 53% (168,169) al 65% como marcador biológico, que aumenta al asociarlo a otros como el CEA. Es

también útil para el seguimiento postquirúrgico y para detectar la presencia de metástasis. Para algunos autores consultados resulta el marcador más sensible y específico con una positividad del 73% que oscila según el tipo histológico entre el 85% para el carcinoma anaplásico de células grandes y el 62.5% para el CPM (170).

II.2.- PROTEINAS DE FASE AGUDA:

Algunas glicoproteínas séricas aumentan tanto en patologías malignas como benignas como respuesta al estímulo inflamatorio; este incremento está probablemente mediado por la Prostaglandina E y la Interleukina 1. A estas glicoproteínas que actúan como moduladores de la inflamación se las llama "Proteínas de Fase Aguda". Se han utilizado las concentraciones séricas de estas proteínas como marcadores tumorales aunque no en el diagnóstico primario de las neoplasias sino para monitorizar en los pacientes la respuesta a la terapéutica. A este grupo pertenecen: Orosomucoide, ceruloplasmina, antitripsina, haptoglobina y alfa-1-glicoproteína ácida. Según los autores consultados no existen diferencias significativas al comparar niveles séricos de estas proteínas de fase aguda entre pacientes con neoplasias malignas de pulmón y pacientes con patología pulmonar benigna. Ambos grupos sin embargo presentan un incremento significativo comparado con los niveles obtenidos en el grupo control sano. Recientemente ha aumentado el interés por el uso de estas proteínas de fase aguda, en concreto alfa-1-glicoproteína ácida, para control de seguimiento de sus niveles plasmáticos durante el tratamiento antineoplásico (171).

III.- OTROS MARCADORES:

III.1.- COBRE (CU):

Está presente en los enzimas que intervienen en los procesos de oxidación, como la tirosinasa, ceruloplasmina (172), amino-oxidasa, citocromo-oxidasa y en la cadena respiratoria. Han sido descritos aumentos en la concentración sérica de cobre en pacientes afectos de carcinoma broncogénico, con relación directa entre sus niveles y la progresión de la enfermedad.

III.2.- ZINC (ZN):

Forma parte de más de 200 sistemas enzimáticos entre los cuales se encuentra la anhidrasa carbónica, fosfatasa alcalina, carboxipeptidasa y leucin-aminopeptidasa. Se halla relacionado con el proceso de síntesis proteica, estabilización de la membrana celular y síntesis del DNA y RNA. En pacientes con cáncer de pulmón, los niveles séricos de este metal sufren descenso respecto a la población general (173).

No sólo incluimos en este apartado los metales como el cobre y el zinc, sino también otras muchas sustancias descritas como marcadores tumorales y que, no pertenecen a ninguna de las clasificaciones anteriores, ó bien aunque pertenezcan a alguna de ellas, han tenido una difusión muy escasa. Entre ellas se encuentran las Tetraciclinas marcadas con Tc-99, la transformación de 2,2-difluorospermidina en 6,6-difluorospermidina y 6,6-difluorospermina, la porción NH₂-terminal de la Pro-opiomelanocortina, la Vimentina, la Pseudouridina, las Neurophisin, las Prostaglandinas, los gangliósidos como el Fuc GM1, la Colinesterasa sérica, la Inmunoperoxidasa Neuroendocrina, la Sinaptofisina y Cromogranina A, la Catepsina-B y la Neopterina, la Fibronectina, la Proteína Pituitaria 7B2, la isoenzima plasmática de la Glutathion S-Transferasa, la Proteína Asociada al Cáncer

de Pulmón (LCAP), la Enzima Convertidora de Angiotensina, el Acido Siálico unido a Lípidos, los Epítomos "sialyl Lex" y "sialil Lea" medidos con los anticuerpos monoclonales KM-93 y KM-231 respectivamente, la Sialyltransferasa y otras variaciones del Antígeno de la Carbohidrasa no descritos previamente como el CA 153 ó el CA 130 y la Toxina Tetánica.

ONCOGENES

INTRODUCCIÓN:

Las células tumorales descienden de una célula ancestral común, que en algún momento, generalmente décadas antes de que un tumor se manifieste, inicia un programa de reproducción indebido. La transformación maligna de una célula acontece después por acumulación de mutaciones en unos genes específicos.

Aunque ya en 1908 los daneses Vilhem Ellerman y Oluf Bang describieron que la inyección de un extracto de un pollo con leucemia transmitía a otro dicha enfermedad, este descubrimiento no tuvo repercusión alguna al considerarse entonces que las leucemias no eran cánceres. Sin embargo, tan solo un año después, Peyton Rous descubrió la existencia del primer virus causante de tumores: el virus del sarcoma aviario, como se le ha denominado, virus del sarcoma de Rous ó RSV (174).

La demostración de que el virus del sarcoma de Rous debía su acción tumoral a la presencia en su genoma de un gen carcinogénico tuvo lugar en 1970, cuando G. Steven Martin aisló mutantes del RSV (175). Ello demostraba la existencia de un gen responsable de la capacidad de causar transformación celular, pero que no afectaba a la replicación del virus. Este gen fue llamado v-src, y se acuñó el término oncogén para referirse al gen causante de cánceres. El descubrimiento de que el RSV llevaba un gen que provocaba la transformación de las células normales en cancerosas abrió la posibilidad de que las propias células de animales contuvieran también genes capaces de causar cánceres. Esta es la “Hipótesis del Oncogen”, avanzada en 1969 por Robert J.

Heuebner y George J. Todaro, que atribuyeron el origen de todos los cánceres a la expresión (activación) de oncogenes introducidos en la línea germinal de los vertebrados por la infección ancestral de virus oncogénicos (retrovirus). El experimento crucial que demostró la existencia de un gen homólogo al v-src del virus del sarcoma de Rous en células normales de pollo se realizó en 1976 en el laboratorio de Michael J. Bishop y Harold E. Varmus, en colaboración con P.K. Vogt. Estos experimentos abrieron la puerta a ensayos análogos y que condujeron al descubrimiento de nuevos oncogenes. Se denominó protooncogenes a las secuencias normales de las células de las que derivan los oncogenes víricos. Los protooncogenes, como veremos, están muy conservados en lo vertebrados y tienen funciones muy importantes en el control del crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis. Los protooncogenes no sólo no son perjudiciales, sino que son beneficiosos para las células; y será solo su expresión excesiva ó la expresión de formas mutadas lo que induce la transformación de las células normales en cancerosas.

Actualmente sabemos que se requiere la activación conjunta de varios oncogenes y la inactivación de por lo menos un gen supresor en el mecanismo de la tumorigénesis. El número de alteraciones genéticas necesarias se desconoce, aunque se ha descrito que debe haber al menos cinco. Hay que destacar la gran heterogeneidad molecular y fenotípica que se observa en la mayoría de los tumores, lo que se debe a las diferentes alteraciones oncogénicas que se van acumulando en las diferentes etapas de la carcinogénesis. En la iniciación del cáncer desempeñan un papel fundamental dos clases de genes que, en sus versiones normales, controlan el ciclo celular. Los protooncogenes activan el crecimiento, mientras que los genes supresores de tumores lo inhiben. Cuando mutan, los protooncogenes pueden convertirse en oncogenes capaces de dirigir una

multiplicación desenfrenada. Las mutaciones pueden hacer que el protooncogen produzca un exceso de proteína estimuladora de crecimiento ó una forma hiperactiva de ésta. Los genes supresores de tumores, por el contrario, contribuyen al cáncer cuando las mutaciones los anulan funcionalmente. La falta de proteína supresora funcional priva a la célula del freno que impide el crecimiento desmesurado.

Los protooncogenes con funciones fisiológicas normales pueden transformarse en oncogenes por mecanismos distintos: mutaciones puntuales, translocaciones y amplificación genética. La mutación puntual es la alteración de una sola base en el ADN y es lo que se produce en la familia ras. Las translocaciones implican una nueva localización de los protooncogenes que pueden ser activados porque se encuentran cerca de elementos promotores ó porque la translocación los libera de secuencias reguladoras normales. La amplificación es el proceso por el que el contenido de ADN se multiplica dentro del genoma, esto provoca un incremento en la cantidad de ARNm y de proteínas; este mecanismo es característico de la activación de los protooncogenes de la familia myc.

Las claves para entender el papel que desempeña en el desarrollo del cáncer los genes supresores de tumores y los protooncogenes, mutados, vienen dadas por el estudio de las funciones celulares que ejercen en condiciones de normalidad, es decir, de genes no mutados. Muchos protooncogenes codifican proteínas que participan en cadenas moleculares de transmisión de señales estimuladoras de crecimiento. Sus oncogenes obligan a la célula a sobreproducir factores de crecimiento, que actúan aumentando la proliferación de células vecinas y de la propia célula. También se han identificado oncogenes de genes de receptores. Los receptores aberrantes liberan en el citoplasma

celular un torrente de señales proliferativas que conducen a la replicación celular. Otros oncogenes perturban la cascada de señales en algún punto del citoplasma. El mejor ejemplo conocido es la familia de oncogenes ras. Las proteínas que cifran los oncogenes ras normales transmiten señales estimuladoras, procedentes de los receptores de factores de crecimiento, a otras proteínas situadas curso abajo en la cascada. Las proteínas codificadas por los genes ras mutados, sin embargo, están siempre activas. En casi una cuarta parte de los tumores humanos, incluidos los carcinomas de pulmón, páncreas y colon, se encuentran proteínas ras hiperactivas. Otros oncogenes, como la familia myc, alteran la actividad de los factores de transcripción nucleares.

Para que una célula malignice, además de promover un crecimiento desenfrenado, tiene que ignorar las señales supresoras que recibe de las células vecinas. Por ello, los genes supresores de tumores faltan ó están anulados funcionalmente en muchos tipos de células cancerosas.

ALTERACIONES FUNCIONALES CELULARES EN LA PATOCRONIA DEL CÁNCER:

Existen varias alteraciones en las células que deben de considerarse como previas a su transformación tumoral, y que pueden ser divididas en:

a.- Alteraciones en la actividad metabólica celular: la mayoría de los componentes carcinogénicos del tabaco son compuestos insolubles que necesitan de la oxidación y conjugación para ser eliminados en un medio acuoso, por ello el organismo sano precisa de enzimas responsables de la desactivación y detoxificación de los mismos, siendo las

más importantes los subgrupos de las glutatión-S-transferasas y de los citocromos p450. Los fenotipos que presentan la combinación de citocromos altos y glutatión-transferasas bajas ó sin efecto tienen limitada la inactivación de los carcinógenos, por lo que favorecen el desarrollo del cáncer de pulmón.

b.- Alteraciones en la reparación del ADN celular: dicha reparación se halla disminuida en las células expuestas al benzopireno-diol-epóxido, y es significativamente baja en pacientes con cáncer de pulmón.

c.- Alteraciones del ciclo celular: el ciclo celular se compone de 4 fases: S de síntesis del ADN, M de mitosis y G1 y G2, ó intervalos entre las fases activas (M,G0,G1,S y G2, sucesivamente), regulados en parte por las ciclinas y las cinasas dependientes de éstas (CDK) que a su vez se encuentran limitadas por inhibidores que modulan la actividad del ciclo celular. Participan además de forma relevante, el gen del retinoblastoma (Rb), la proteína p53 y la proteína E2F. De la interrelación de estos factores resulta la progresión del ciclo celular. El primer paso crucial del ciclo tiene lugar en la fase G1 tardía. Factores como PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) y factores de progresión como IGF-1 (factor de crecimiento de la insulina) pueden interactuar en este punto para estimular la proliferación celular. Ambos factores hacen aumentar el número de células y por tanto, el tamaño tumoral en fases tardías de su desarrollo.

CLASIFICACIÓN:

Tres grupos diferentes de genes se han identificado por sufrir frecuentemente modificaciones en el cáncer:

A.- Protooncogenes: ras, myc, c-erb-B1, c-erb-B2/neu, BCL-2, c-fos, c-jun, c-raf1.

B.- Genes supresores de tumores: Rb-1, p53, p16, NM-23.

C.- Genes reparadores del ADN.

A.- Protooncogenes:

Son genes normales que llegan a ser oncogenes cuando sufren una mutación. Son genéticamente dominantes, y es suficiente la variación de un solo alelo para desarrollar la alteración reproductora celular (176):

1. Oncogenes ras:

Los oncogenes K-ras, H-ras y N-ras codifican unas proteínas muy parecidas, denominadas p21. Esta proteína es una G-proteína implicada en la transmisión de señales a través de la membrana celular. La alteración en el gen da lugar a una imposibilidad de la proteína de hidrolizar GTP a GDP, y como GTP-ras es la forma activa de la proteína, esto produce una estimulación de la replicación celular.

Como ya se ha mencionado, la proteína oncogénica queda atrapada en su forma activa unida a GTP, por mutaciones que inhiben la hidrólisis de GTP, favoreciendo de esta manera el aumento en la concentración de ras p21-GTP. Esta situación actúa sobre

la célula tanto induciendo transformación morfológica como favoreciendo la pérdida de la inhibición por contacto (177,178). La hipótesis inicial de que una mutación ras podría preceder al desarrollo de una neoplasia fue formulada por Kumar y Barbacid (179), sugiriendo que las muestras de esputo podrían ser estudiadas para detectar la presencia de K-ras en células exfoliadas en la vía aérea.

El más frecuentemente implicado en el cáncer de pulmón es el K-ras, del que se han descrito mutaciones puntuales en el codón 12 y ocasionalmente en los codones 13 y 61. Se estima que un 30 % de los tumores humanos presentan un gen ras mutado. En el cáncer de pulmón su incidencia varía entre un 90% en el caso de los adenocarcinomas, en el 23% de los carcinomas de células grandes y entre un 8% en los carcinomas epidermoides. Estas mutaciones se han asociado a un peor pronóstico en los pacientes tratados quirúrgicamente, lo cual hace pensar en la necesidad de tratamientos complementarios a la cirugía en este grupo de pacientes. Estudios in vitro han demostrado que mutaciones en K-ras confieren una mayor resistencia al cisplatino y a la radioterapia a las líneas celulares portadoras (180).

La mutación en K-ras se debe a la acción carcinogénica del benzopireno, que es un componente del humo del tabaco. Las mutaciones K-ras son más frecuentes en los tumores de pacientes fumadores (177,181), e igualmente en los exfumadores que han dejado el hábito tabáquico incluso durante más de 15 años; se trataría de una alteración irreversible.

2. Oncogen myc:

El gen myc codifica al menos tres tipos de proteínas c-myc, n-myc y l-myc. El oncogén c-myc situado en el cromosoma 8 codifica una fosfoproteína celular de 62 Kd,

que es inducida durante la proliferación celular. La afinidad de las proteínas myc por los ácidos nucleicos del ADN y su localización nuclear sugirieron el papel desempeñado por estas proteínas en el control de la expresión génica y de la replicación del ADN.

La proteína myc parece ser una de las claves para el control de la proliferación celular. Los estudios realizados sobre la expresión del gen c-myc demuestra la existencia de una gran correlación entre la cantidad del ARN del del c-muc y el estado proliferativo de la célula. En condiciones normales este gen se activa por factores de crecimiento. Las líneas celulares que expresan c-myc presentan una independencia relativa a los factores de crecimiento para la proliferación y evitan la entrada de la célula en fase de reposo, manteniéndola permanentemente en proliferación activa.

El mecanismo íntimo que explica la relación de myc con la proliferación no está claro, se ha propuesto que actúe como factor de transcripción, sin su interacción con proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular ó incluso una participación directa sobre la replicación del ADN.

En el cáncer de pulmón se han visto alteraciones en los 3 componentes de la familia, de forma que hay amplificación en un 10% de carcinomas no microcíticos (en la mitad de los casos c-myc) y en el 10-40% de los microcíticos (en las dos terceras partes de los casos c-myc), correlacionándose con peor pronóstico. También se encuentra más sobreexpresado en tumores tratados (28%) que en no tratados (182,183).

3. Oncogen c-erbB-1:

El gen erbB-1 codifica el factor de crecimiento epidérmico, una glucoproteína transmembrana de 170 kD, con actividad tirosincinasa intrínseca, cuya función esta relacionada con la activación de la transcripción.

4. Oncogen c-erbB-2/neu:

El oncogén c-erbB-2 (al que también se le llama HER-2/neu) está localizado en el q21 del cromosoma 17 humano y codifica una proteincinasa de membrana denominada p185 con estructura de receptor de superficie celular para un factor de crecimiento, con un peso de 185 KDa. La activación del protooncogén se produce por una mutación puntual en el dominio transmembrana.

Esta proteína es estructuralmente muy similar al EGFr y su expresión conduce a la activación de señales de proliferación al interior celular, incluso en ausencia del receptor de crecimiento específico. Además, se ha demostrado que las células del cáncer de pulmón producen un factor que se liga a su receptor y provoca una autoestimulación por vía autocrina (184).

Se sobreexpresa en las fases iniciales de la transformación tumoral hasta en el 25% de los carcinomas no microcíticos. Se expresa con niveles bajos en el tejido pulmonar normal, por las células ciliadas, los neumocitos tipo II y las glándulas de la submucosa bronquial. Se ha relacionado con la displasia bronquial (185). La sobreexpresión de la proteína p185 se relaciona con buen pronóstico en el CPNM según algunos estudios (186,187,188,189,190,191,192), pero no en otros (193,194,195, 196,197,198,199,200).

Se encuentra presenta en un 30% de los adenocarcinoma y un 2% de los epidermoides según algunos trabajos, otros autores comunican cifras dispares: 81% y 44% (201), 30% y 14% (195), 35% y 33% (202) respectivamente.

También se ha encontrado aumento según estadios, así se observa una mayor sobreexpresión del oncogén c-erbB-2 en estadios II/III (81 y 87%) que en los I (50%)

(201), estos mismos datos son obtenidos por otros autores (203). Esta sobreexpresión parece correlacionarse con los carcinomas epidermoides que presentan ganglios positivos, mientras que en pacientes con adenocarcinomas, se encuentran tanto en aquellos que presentan ganglios positivos como en los que son negativos (201).

Su sobreexpresión se ha relacionado también con una mayor resistencia de estos tumores al tratamiento con quimioterapia y radioterapia (204,205); esta resistencia podría abrir las puertas a una nueva terapia con anticuerpos monoclonales frente a c-erbB-2. El trastuzumab, un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante que reconoce el c-erbB-2 y por tanto bloquea su actividad, se encuentra en estudio (206).

5.- Oncogen BCL-2:

Pertenece a la familia de oncogenes que codifican proteínas relacionadas con la activación e inhibición de la apoptosis y se encuentra en el cromosoma 18. La formación de heterodímeros bcl-2/BAX inhibe la apoptosis y favorece la supervivencia de la célula, mientras que la formación de homodímeros BAX/BAX induce la apoptosis. La actividad de la proteína p53 provoca la formación de BAX, lo que termina favoreciendo la apoptosis. La expresión de bcl-2 está elevada en el 75% de carcinomas microcíticos y en el 95% de los no microcíticos, y se encuentra aumentada en células basales del epitelio peritumoral (207,208).

6.- Oncogenes c-fos y c-jun:

Codifican una proteína nuclear que forma un complejo denominado AP-1 con una zona específica de reconocimiento del ADN; se trata de otro factor de transcripción. Se

expresa tanto en el pulmón normal como en el carcinoma broncogénico. Su actividad parece estar relacionada con otros oncogenes como el ras (209, 210).

7.- Oncogen c-raf-1:

El protooncogen raf-1 se localiza en la región 3p25 y codifica una fosfoproteína con actividad tronina-serinquinasa implicada en la señal de transducción de varias vías mitógenas. Se expresa en el pulmón normal, en el carcinoma pulmonar de células pequeñas y en el no microcítico, donde presenta frecuentemente pérdida de heterozigosidad (211).

B.- Genes supresores de tumor:

La idea de que existen genes que inhiben la aparición de cánceres está implícita en la hipótesis de Theodor Boveri de 1903 sobre la existencia de ``aumentos y también de pérdidas de cromosomas en las células cancerosas`` (212). Sin embargo, hubo que esperar muchos años antes del descubrimiento de delecciones del DNA en tumores humanos y de la correlación entre la pérdida de genes específicos y ciertos tipos de cánceres. La primera evidencia funcional de la existencia de genes cuyos productos pueden inhibir ó suprimir la proliferación de células cancerosas provino de los experimentos de Henry Harris y colaboradores (213). Estos investigadores fusionaron células normales con células cancerosas y estudiaron el comportamiento de las células híbridas así formadas. Éstas crecían y mantenían algunas características de las células cancerosas, puesto que su proliferación era independiente de anclaje a sustrato y además resultaba inhibida por el contacto con otras células, pero perdían la capacidad de producir tumores cuando eran inyectadas en animales. El hecho de que la fusión de una célula normal con otra cancerosa originara otra célula normal indicaba la existencia de

algún gen ó genes en la célula normal que suprimían el potencial tumorogénico de la célula cancerosa. Además, los mismos resultados se obtenían con células cancerosas obtenidas de cualquier tipo de tumor ó generadas por acción de cualquier agente carcinogénico.

Las células cancerosas parecen haber perdido genes para el adecuado control de su proliferación y comportamiento. A estos genes se les ha llamado de diversas maneras: antioncogenes, oncogenes recesivos, genes de susceptibilidad al cáncer y, como ahora se prefiere, genes supresores de tumores. Esta hipótesis se reforzó al comprobarse que la revisión del fenotipo canceroso se perdía con el tiempo. Ello es debido a que las células híbridas, que contienen los cromosomas de la célula normal y de la célula cancerosa, pierden progresivamente cromosomas provenientes de la célula normal. Este descubrimiento permitió la identificación de los cromosomas donde se localizan los distintos genes supresores. La comprobación de estas predicciones se realizó mediante la fusión de minicélulas artificiales, que contienen un único cromosoma, con células cancerosas, lo que condujo a la localización de genes supresores en cromosomas específicos; esto fue demostrado por Weissman al fusionar minicélulas artificiales que contenían el cromosoma 11 con líneas celulares del tumor de Wilms comprobándose la supresión de la capacidad tumorogénica de éstas (214).

A diferencia de los oncogenes, donde un solo alelo mutante afecta al fenotipo de la célula, la pérdida de la función de un gen oncosupresor sólo se produce cuando han mutado los dos alelos (individuos homocigóticos), ``pérdida de heterocigosidad`` (215). Es decir, la forma mutada de un gen oncosupresor se expresa con carácter recesivo. Esto es así puesto que la mutación produce pérdida de función en la proteína, pero las moléculas de proteína sintetizadas a partir del alelo normal pueden suplir esa carencia,

al menos parcialmente. Al igual que en el caso de los oncogenes, la herencia de los genes oncosupresores mutados es la correspondiente a su carácter recesivo, pero sólo tiene lugar cuando la mutación ha afectado a células germinales

La probabilidad de mutación somática en dos alelos de una misma célula es baja por lo que la homocigosis generada de novo es muy infrecuente; sin embargo, los individuos heterocigóticos en un gen supresor (que han heredado un alelo mutado) tienen predisposición a la aparición de cáncer, ya que sólo necesitan una mutación somática en el otro para perder totalmente la función de la proteína supresora.

Dentro de este grupo de genes los mejores estudiados han sido:

1.- Gen Rb-1 y gen p16:

Ambos genes se encuentran muy relacionados entre sí. El gen del retinoblastoma (Rb-1) está situado en la región q14.11 del cromosoma 13. Codifica una proteína de 110 kD, denominada Rb, cuyo papel está relacionado con la división celular; se encuentra activa en estado hipofosforilada, actuando como inhibidora en la fase G1. Se inactiva mediante hiperfosforilación, proceso regulado por la proteína p16 codificada por el gen del mismo nombre, localizado en el cromosoma 9p21. La disrupción en la función de la p16 impide el bloqueo de la fosforilación de la proteína Rb, que pasará al estado inactivo. La inactivación de p16 puede originarse por mutación de un alelo y delección del otro ("pérdida de heterocigosidad"), mutación puntual del alelo restante ó inactivación mediante mutilación del exón 1 del gen p16. En este sentido se ha descrito la inactivación de p16 por mutilación en las fases tempranas del desarrollo del carcinoma no microcítico, mientras que las delecciones y/ó las mutaciones en ambos alelos ocurren más frecuentemente en fases tardías y se correlacionan con baja

supervivencia a los 5 años, sugiriendo que, junto con el p53, es un fenotipo tumoral agresivo. La expresión de la proteína Rb está alterada en el 60-90% de carcinomas microcíticos y en un 15-30% de los no microcíticos, con más frecuencia en estadios III y IV (216, 217, 218, 219). La hipermetilación del exón 1 de p16 en el cáncer de pulmón también ha sido estudiada, encontrándose al menos en un 38 % de los carcinomas no microcíticos (47 % adenocarcinomas) y rara vez en microcíticos. Otra evidencia que relaciona el gen Rb con el desarrollo del cáncer de pulmón es la observación de que los portadores de una mutación germinal del gen Rb, parientes de pacientes con retinoblastoma, tienen una probabilidad 15 veces mayor de morir por cáncer de pulmón que la población general (220). Además, en estudios in vitro, la reintroducción en las células tumorales del gen Rb salvaje suprime el crecimiento de las células de los tumores microcíticos (221).

2.- Gen p53:

El gen p53, descubierto en 1979, es el gen más comúnmente alterado en multitud de cánceres humanos. Las alteraciones pueden ser adquiridas somáticamente ó transmitidas a través de la línea germinal (Síndrome de Li-Fraumeni) (222).

La proteína p53 es una fosfoproteína nuclear de 393 aminoácidos y 53 kD de peso molecular (223). Está codificada por el gen supresor p53, localizado en la región 13.1 del brazo corto del cromosoma 17 (223,224) de 16 a 20 kb de DNA. El gen está formado por 11 exones, interrumpidos por 10 intrones; el primer exón no codifica para la síntesis de la proteína y está seguido por un primer gran intrón de 8 a 10 kb antes de los exones 2 a 11. La proteína p53 contiene un dominio ácido N-terminal activador de la transcripción (aminoácidos 1-43), otro de unión a secuencias específicas de DNA que

hacen de p53 un factor de transcripción (aminoácidos 320-360), y otro carboxiterminal más inespecífico (aminoácidos 330-360) de modulación de la actividad transcripcional y de unión inespecífica a DNA y RNA.

La mayoría de las mutaciones puntuales del gen que se encuentran en las células tumorales afectan al dominio central de unión al DNA de la proteína, y dentro de éste, a ciertas posiciones muy concretas ó ``hot spots`` (puntos calientes) (222): los codones que codifican a los residuos 175, 248, 249, 273 y 282.

La fosfoproteína p53 realiza diferentes funciones:

- Detener el ciclo celular
- Provocar apoptosis.
- Inhibir el crecimiento tumoral.
- Preservar la estabilidad genética.

La proteína p53 es el paso central de la respuesta celular a una variedad de estímulos (225,226), entre los cuales se encuentran las lesiones del DNA, la hipoxia, el shock térmico, algunas alteraciones metabólicas y ciertas citokinas. Todos ellos pueden activar la proteína p53, y ésta inicia una serie de acontecimientos que culminan, bien con la detención del ciclo celular para permitir la reparación del daño celular, progresando posteriormente el ciclo de división celular ó bien con la muerte celular (apoptosis). Si existe alguna alteración oncogénica en estas células dañadas, se puede iniciar un proceso neoplásico.

En circunstancias normales las células contienen bajos niveles de proteína p53, pero ante estímulos de estrés celular se produce el acúmulo ó la activación de p53 (225,226), iniciándose así el ciclo de p53. Un ejemplo de esto es la rápida aparición de

niveles detectables de p53 en la epidermis y dermis superficial de los fibroblastos de la piel de un adulto normal cuando ha estado expuesto a dosis de radiación ultravioleta suficiente para causar una pequeña quemadura (227).

La proteína p53 induce la transcripción de diferentes genes que controlan la parada del ciclo celular ó la apoptosis (228,229):

- mdm-2: la proteína nuclear Mdm-2, parece ser crucial en el control de p53 y tiene un papel clave en el acúmulo de p53 en respuesta al estrés. Mdm-2 es una fosfoproteína compuesta por 491 aminoácidos que puede unirse a p53; no sólo bloquea su actividad biológica sino que también degrada a p53 por la vía de la ubiquitina. Mmd-2 puede considerarse un componente de la vía de p53 ya que su transcripción es estimulada por p53 y por ello actúa como un mecanismo de retroregulación negativa controlando los niveles de p53 (230).
- p21/waf1/Cip1: que es un inhibidor de los complejos ciclina/CDK (Cyclin-Dependent Kinase), y que por tanto frena el ciclo celular en la fase G1 (231).
- gadd45 (growth arrest and DNA damage-45): la proteína gadd45, al igual que p21, secuestra el PCNA, una subunidad de la DNA polimerasa δ , impidiendo de este modo la replicación.
- bax: el gen bax codifica una proteína con homología a la proteína Bcl-2. Estas dos proteínas son críticas en la regulación del proceso apoptótico, Bcl-2 aumenta la supervivencia celular mientras Bax promueve la muerte celular (232).
- IGF-BP3 (Insulin-like Growth Factor-Binding Protein-3): su proteína promueve la apoptosis por bloqueo de la actividad mitótica del factor de crecimiento insulina-like.

Existen muchas evidencias de que la proteína p53 desempeña un papel importante tanto en la carcinogénesis como en la respuesta al tratamiento antitumoral (233). A través de la interrupción de la vía de apoptosis, la pérdida de la función de p53 puede conferir a la célula tumoral una gran resistencia a la radioterapia y a gran cantidad de fármacos antineoplásicos.

En la investigación de p53 como factor pronóstico es importante analizar el método de detección de las aberrancias del gen. Existen diferentes técnicas que incluyen la electroforesis en gel para localizar fragmentos de ADN que poseen mutaciones (SSCP), secuenciación directa del gen p53, estudio genético de la función de transcripción del gen y análisis inmunoiluminométrico para detectar concentraciones anormalmente elevadas de la proteína. Normalmente la proteína p53 es prácticamente indetectable por técnicas que utilizan anticuerpos. Sin embargo, la proteína mutada resiste la degradación, lo que conduce a su sobreexpresión; así, en la proteína normal tiene una vida media de 6 a 20 minutos, mientras que la mutada es de 6 horas. El gran problema del análisis inmunoiluminométrico de la sobreexpresión proteica reside en que no todas las alteraciones de p53 conducen a la sobreexpresión de la proteína. Se ha correlacionado la detección de la alteración en el gen con los resultados de cuantificación de la proteína sobreexpresada por métodos inmunohistoquímicos con un porcentaje del 65-70% en algunos trabajos (234). La influencia en el pronóstico del CPNM que pueda poseer la oncoproteína p53 ha sido objeto de muchos estudios aunque los resultados son todavía contradictorios. Existen trabajos que relacionan con un buen pronóstico el resultado negativo para p53 (193,235,236). Horio y col. estudiaron la importancia pronóstica de las mutaciones de p53 y la pérdida del alelo del cromosoma 3p en 70 pacientes con CPNM sometidos a resección pulmonar, con intención curativa.

Detectaron mutaciones de p53 en el 50% de los casos y deleciones de 3p en el 49%. Demostraron un peor pronóstico en los estadios I y II de la enfermedad en aquellos pacientes que expresaban mutaciones de p53 con diferencias estadísticamente significativas respecto a los que no lo expresaban (237). No se demostró asociación entre la deleción del cromosoma 3p y el pronóstico de la enfermedad (238). Otros estudios tambien han demostrado correlación entre la positividad de p53 y un peor pronóstico (239).

Las mutaciones se producen generalmente en la parte media del gen (codones 157, 245, 248 y 273). Las mutaciones en el codón 157 parecen ser únicas en el cáncer de pulmón, íntimamente ligadas con los benzopirenos del tabaco, produciendo transversiones guanina-timina, de GC a TA. Los sujetos no fumadores que desarrollan cáncer de pulmón tienen otras mutaciones totalmente diferentes (240). El p53 puede también inactivarse por oncogenes víricos SV40, proteínas de adenovirus tipo5 y de HPV 16 y 18, y es probablemente el gen más frecuentemente mutado en el cáncer (241), en más del 50% de los carcinomas no microcíticos (sobretudo en epidermoide y raro en adenocarcinoma broncoalveolar) y en más del 80% de los microcíticos (242). Igualmente se han documentado mutaciones de p53 en lesiones premalignas, la metaplasia y la displasia. Existen nuevos estudios en los que se relaciona la positividad de p53 con la aparición de ganglios positivos (243). En los tumores neuroendocrinos las mutaciones de p53 se observan en formas atípicas hasta en el 40% de los casos, con cierta relación entre la expresión y el comportamiento.

El p53 también tiene interesantes relaciones con otros genes. La cooperación entre Rb y p53 determina si éste induce la detención en G1 ó la apoptosis en caso de daño del

ADN. Con la pérdida de Rb se inclina el balance hacia la apoptosis, un factor clave en la carcinogénesis.

La suspensión del tabaco puede frenar la expansión de células anormales, pero las alteraciones genéticas son irreversibles. De hecho, en los sujetos exfumadores se encuentran pérdidas de heterozigosidad en el 62% de los casos; recientemente se han descrito en los brazos cromosómicos 3p y 9p, así como mutaciones del gen p53 en lesiones displásicas (verdaderas lesiones precancerosas) y en las hiperplasias adenomatosas atípicas (244).

3.- Gen NM –23:

El gen NM-23 esta localizado en el brazo largo del cromosoma 17 y codifica una proteína con actividad difosfatocinasa. Se ha comprobado que concentraciones bajas de la proteína NM-23 se realiza con un alto potencial metastásico en varios tumores. La deleción de un alelo de NM23 ha sido demostrada en adenocarcinomas de pulmón aunque no se ha visto correlación con la supervivencia (245).

C.- Genes reparadores:

El tercer grupo, genes reparadores de ADN, también se comportan con carácter recesivo (246):

1.- Inestabilidad de microsatélites:

Dentro del genoma humano existen unas cortas secuencias de bases repetidas, que se heredan de forma mendeliana y que se denominan microsatélites. Por su herencia de

tipo mendeliano forman parte de lo que se conoce como “huella dactilar genética” de todos los individuos. Los microsatélites son secuencias no codificadas para proteínas, constituidas por repeticiones de nucleótidos dispuestos en tandem, en un número variable. Estas secuencias repetitivas son polimórficas entre la población, es decir, la longitud de un microsatélite varía de unos individuos a otros. Es por ello que todo estudio de inestabilidad génica en cáncer debe realizarse comparando el material génico de tejido normal y tejido tumoral de un mismo paciente, y observar las posibles diferencias que se encuentran entre uno y otro. Estas secuencias son especialmente sensibles a deslizamientos de la ADN polimerasa durante la replicación, originándose en el ADN bucles de inserción y/o delección (IDL) que contienen un número de múltiples variables de la unidad de repetición (247). En ausencia de esos mecanismos de reparación, los nucleótidos mal apareados que contienen los IDL pueden fijarse al genoma en la siguiente ronda replicativa produciendo el fenómeno de inestabilidad de microsatélites (inserciones y deleciones que alteran el patrón de bandas de ADN microsatélite correspondiente entre tejidos sanos y afectados de un mismo individuo). Este tipo de alteraciones fue descrito por primera vez por Perucho y col. (248) y pueden ser utilizadas para poner de manifiesto alteraciones en los genes implicados en los mecanismos de reparación postreplicativos.

Existe inestabilidad genética de microsatélites en la mayoría de los cánceres humanos. Comparando la longitud de microsatélites del ADN de células tumorales con el ADN de células normales se observan con frecuencia en el ADN tumoral alelos extras de tamaño diferente que no se detectan en el ADN de las células no tumorales. La presencia de estos alelos de diferente tamaño corresponde a los denominados errores de

replicación. A veces, se puede demostrar la desaparición de alelos enteros en las células tumorales, que se denominan pérdidas alélicas.

Existen numerosas dianas de inestabilidad genética definidas para el cáncer de pulmón. La mayoría de regiones alteradas descritas en los tumores pulmonares corresponden a genes supresores tumorales ó a zonas todavía no caracterizadas, pero en las que se sospecha de la existencia de algún otro gen supresor tumoral.

Existen genes responsables de la inestabilidad de microsatélites. Entre los genes reparadores se han descrito el hMSH2, hMLH1, hPMS1 y hPMS2.

En el cáncer de pulmón se ha descrito su mayor presencia entre los microcíticos y los de células grandes (249).

2.- Pérdida de heterozigosidad:

Definimos como pérdida de heterozigosidad a la ausencia de uno de los dos alelos en el ADN tumoral con respecto al ADN de tejido no tumoral en un individuo que es heterocigoto para el carácter que queremos estudiar. El estudio de la pérdida de heterozigosidad en ciertas regiones cromosómicas se ha extendido a casi todos los tumores humanos y a casi todo el genoma. Una de las zonas más analizadas ha sido el brazo corto del cromosoma 3.

En 1982, Whang-Peng realizó un análisis citogenético de 16 líneas celulares de carcinoma microcítico de pulmón. En los 16 casos se observó la existencia de una deleción en el brazo del cromosoma 3. Estos resultados se han repetido en otras series (250) y se ha confirmado que prácticamente la totalidad de los carcinomas de pulmón de células pequeñas presentan una pérdida en la región 3p14-25. Esto hace pensar en la posible existencia de un gen supresor para el cáncer microcítico de pulmón en dicha

zona, aunque también se ha encontrado pérdida de heterozigosidad en 3p en tumores renales y de mama.

Dentro de esta región cromosómica la zona común que se ha encontrado delecionada en prácticamente todos los cánceres de pulmón microcíticos y en muchos no microcíticos es la próxima al locus ERBA2 (251). Se ha demostrado que el gen ERBA2 no es un gen supresor de tumores que intervenga en el cáncer de pulmón, aunque se sospecha que el oncogén supresor del cáncer de pulmón esta muy próximo al gen ERBA2. Prácticamente todos los carcinomas microcíticos de pulmón, y entre el 20 y el 50% de los no microcíticos, presentan pérdida de heterozigosidad en este cromosoma (252).

También en el cromosoma 5q existe una región con mayor probabilidad de pérdidas alélicas, la 5q13-31 (253). La pérdida de heterozigosidad en 5q es un marcador de la progresión de la enfermedad, al relacionarse más frecuentemente con los casos avanzados.

En resumen, las pérdidas de heterozigosidad en el cromosoma 3 parecen tener importancia en el desarrollo del cáncer de pulmón, aunque la alteración exacta, su lugar en la secuencia y el grado de importancia están por definir. Otras regiones afectadas son 8p, 9p y 11p en los carcinomas no microcíticos, y 5q, 13q y 17 q en los microcíticos. También nos puede ayudar a diferenciar a los tumores neuroendocrinos de células grandes (254).

3.- Telomerasas:

Los telómeros son porciones de ADN localizados en los extremos de los cromosomas, que tienen funciones diversas en la mitosis celular, "gastándose" con cada

una de ellas, de modo que son causa y "marca" del envejecimiento celular. Existe una ribonucleoproteína, la telomerasa, con actividad de polimerasa, capaz de añadir secuencias de aminoácidos a los terminales gastados del telómero, de modo que "inmortaliza" a la célula. La actividad de la telomerasa en las células somáticas normales es muy baja ó nula, mientras que en determinadas líneas celulares, en las células germinales y en las células neoplásicas, es alta, lo que sugiere que la actividad de la telomerasa puede ser de gran importancia en la oncogénesis. La actividad de la telomerasa, ó el tamaño aumentado del telómero, se ha encontrado en casi todos los carcinomas microcíticos de pulmón y en más del 70% de los no microcíticos, e incluso su expresión puede correlacionarse con el potencial de malignidad de un tumor determinado. La actividad de la telomerasa se encuentra asociada a la pérdida alélica de algunos genes supresores, como es el caso de p53 y Rb. En algunas lesiones preneoplásicas del pulmón, como son la hiperplasia (aunque no en la hiperplasia adenomatosa atípica), la displasia y el propio carcinoma in situ, la actividad de la telomerasa está aumentada si bien no en el grado que se objetiva en la mayoría de los carcinomas invasores.

Se necesitan 6 ó 7 mutaciones genéticas distintas para que una célula normal sortee el mecanismo de control orgánico y de lugar a una célula cancerosa. Si las mutaciones tienen lugar a un ritmo habitual, la probabilidad de que una misma célula sufra 6 mutaciones es muy raro. Sin embargo, en algunas situaciones se producen incrementos en el riesgo de acumular mutaciones. Tal sucede cuando la proliferación celular es suficiente para crear una gran población diana con alguna mutación, incrementando su frecuencia al alterar la estabilidad del cromosoma entero. Probablemente la mutación sencilla más común a todos los cánceres humanos es la del

gen p53 en 17p13, que está presente en la mayoría de los microcíticos (80%) y en menor porcentaje en los no microcíticos (50%), arrastrando pérdida de la función supresora tumoral, inhibiendo la apoptosis y favoreciendo la proliferación celular (255,256).

II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

El cáncer de pulmón es el tumor más frecuente en el mundo y el tercero en Europa, además del causante de una mayor mortalidad (1).

El 80% de los tumores de pulmón corresponden a tumores no microcíticos, conocidos en la bibliografía como NSCLC (non-small-cell-lung-cancer).

El tratamiento más eficaz para estos enfermos es la cirugía, aunque la resección completa sólo se puede realizar en menos del 25% de los pacientes en el momento del diagnóstico, y de los resecables entre un 30-70% de los casos recidivan y mueren por esta enfermedad.

Así, parece obvia la necesidad de realizar un diagnóstico precoz en estos pacientes que permita la detección del tumor en un estadio más inicial subsidiario de un tratamiento quirúrgico con intención curativa.

Los dos factores pronósticos tradicionalmente reconocidos han sido el tipo histológico y el estadio tumoral (TNM). Existen sin embargo, numerosos casos que se alejan de la evolución esperada tras la aplicación de estos factores pronósticos. Otros factores parecen pues influir en la agresividad de cada tumor independientemente del tamaño, la existencia ó no de adenopatías, la presencia ó no de metástasis y el tipo histológico. Un área con creciente interés ha sido la búsqueda de marcadores tumorales secretados por las células neoplásicas, aunque no de forma exclusiva, capaces de añadir información pronóstica en la valoración del paciente. Además, el desarrollo de la biología molecular ha permitido conocer la existencia de múltiples oncogenes y oncoproteínas implicados en la aparición y el desarrollo de los tumores.

La elevación del antígeno carcinoembrionario (CEA) y el antígeno carbohidrato 12.5 (CA 12.5), así como la sobreexpresión de las proteínas p53 y p185, codificadas por los genes p53 y c-erbB-2 respectivamente, son anomalías que se producen con frecuencia en el carcinoma no microcítico de pulmón.

La hipótesis de nuestro trabajo se basa en que la presencia de estas alteraciones biológicas puede relacionarse con una situación de mayor agresividad tumoral, independientemente del tipo histológico y del estadio tumoral, y quizás una diferente respuesta a los tratamientos antineoplásicos actualmente empleados.

OBJETIVOS

Con el propósito de analizar la utilidad pronóstica de estos marcadores tumorales y oncogenes en pacientes intervenidos de cáncer de pulmón no microcítico con intención curativa, se desarrolló un estudio multicéntrico de cohorte clínica y prospectivo, planteándose los siguientes objetivos:

1. Analizar las concentraciones séricas preoperatorias de los marcadores tumorales CEA y CA 12.5.
2. Analizar las concentraciones en tejido de la proteína p53 (codificada por el gen supresor p53) y de la proteína p185 (codificada por el oncogen c-erbB-2).
3. Establecer la relación entre las concentraciones de los marcadores tumorales en suero CEA y CA 12.5 con otras variables pronóstico como son: el tamaño, el tipo histológico, el grado de diferenciación y el estadio tumoral (TNM).

4. Establecer la relación entre la sobreexpresión de p53 y p185 en tejido con otras variables pronóstico como son: el tamaño, el tipo histológico, el grado de diferenciación y el estadio tumoral (TNM).
5. Conocer la relación existente entre los niveles en suero de los marcadores tumorales CEA y CA 12.5 y la sobreexpresión de las proteínas p53 y p185 en tejido, con la supervivencia de los pacientes del estudio.
6. Conocer la relación existente entre las concentraciones en suero de los marcadores tumorales CEA y CA 12.5 y la sobreexpresión de las proteínas p53 y p185 en tejido, con el intervalo libre de enfermedad de los pacientes del estudio.
7. Determinar el valor predictivo de las variables clínicas y de los marcadores tumorales CEA, CA 12.5, p53 y p185 en relación con el riesgo de fallecer mediante un análisis multivariante.
8. Determinar el valor predictivo de las variables clínicas y de los marcadores tumorales CEA, CA 12.5, p53 y p185 en relación con el riesgo de recidiva (local y/o metástasis) mediante un análisis multivariante.

III.- PACIENTES Y MÉTODOS

III.1.- PACIENTES

PERIODO Y LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO:

Este proyecto de tesis doctoral se ha basado en un estudio multicéntrico de cohorte clínica y prospectivo realizado con pacientes intervenidos con el diagnóstico de cáncer de pulmón no microcítico en el Servicio de Cirugía General 2 (Unidad de Cirugía Torácica) del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital de Cruces de Baracaldo y en el Servicio de Cirugía Torácica del Hospital Dr. Negri de Gran Canarias.

El periodo de reclutamiento es desde Enero de 1997 a Octubre de 1998 y el periodo de seguimiento es desde Octubre de 1998 a Enero de 2003.

La mediana de seguimiento fue de 34 meses y sólo un 25% de los pacientes fueron seguidos por encima de los 71 meses, con lo que se decidió el límite de la inferencia en 48 meses, para obtener un buen tamaño muestral en las conclusiones.

Toda la información se centralizó en el Centro Nacional de Epidemiología del Instituto de Salud Carlos III.

POBLACIÓN DEL ESTUDIO:**1.- Muestra poblacional:**

Nuestra serie está compuesta por pacientes con diagnóstico anatomopatológico de carcinoma broncogénico no microcítico intervenidos con intención curativa.

Aquellos pacientes que no cumplieron ó sufrieron alguna de las siguientes circunstancias clínicas fueron rechazados para el estudio:

- Pacientes con estadio tumoral IIIB no resecables y estadio IV.
- Mortalidad peroperatoria (durante los 30 primeros días postoperatorios).
- Mortalidad postoperatoria por causas no relacionadas con su patología tumoral pulmonar.
- Tratamiento con Radioterapia y/ó Quimioterapia neoadyuvante.

La población final de nuestro estudio se compone de 168 pacientes, con una edad media de 62 años (rango entre 33 y 82 años).

Su distribución por género fue: 153 varones (91,1%) y 15 mujeres (8,9%) (ver figura 11).

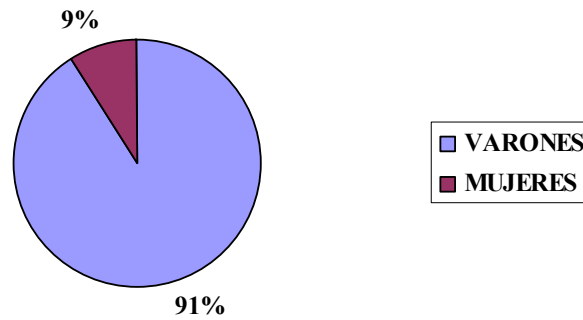


Figura 11. Distribución de la serie por género.

2.- Características de los tumores y tratamiento:

La distribución de las lesiones según su localización fue:

- Lóbulo superior derecho: 44 (26,2%).
- Lóbulo medio: 10 (6,0%).
- Lóbulo inferior derecho: 18 (10,7%).
- Lóbulo superior izquierdo: 47 (28,0%).
- Lóbulo inferior izquierdo: 16 (9,5%).
- Bronquio principal derecho: 9 (5,4%).
- Bronquio principal izquierdo: 11 (6,5%).
- Localización múltiple derecha: 8 (4,8%).
- Localización múltiple izquierda: 2 (1,2%).
- Localización múltiple bilateral: 3 (1,8%).

Los tumores presentaron diferentes tamaños, por lo que se agruparon en dos grupos para su estudio: lesiones menores de 2 cm. que se observaron en 9 pacientes (5,4%) y lesiones mayores ó iguales a 2 cm. en 159 pacientes (94,6%).

La distribución según el diagnóstico anatomopatológico de acuerdo con la OMS-1999 (32) fue: 107 casos con carcinoma epidermoide (63,7%), 42 adenocarcinomas (25,0%), 10 carcinomas de células grandes (6,0%), 5 adenoca. bronquioalveolares (3,0%) y 4 que se incluyeron como "otros" tipos histológicos, y que tras revisar la serie, todos los tumores incluidos en este último grupo resultaron ser tumores adenoescamosos (2,4%) (figura 12).

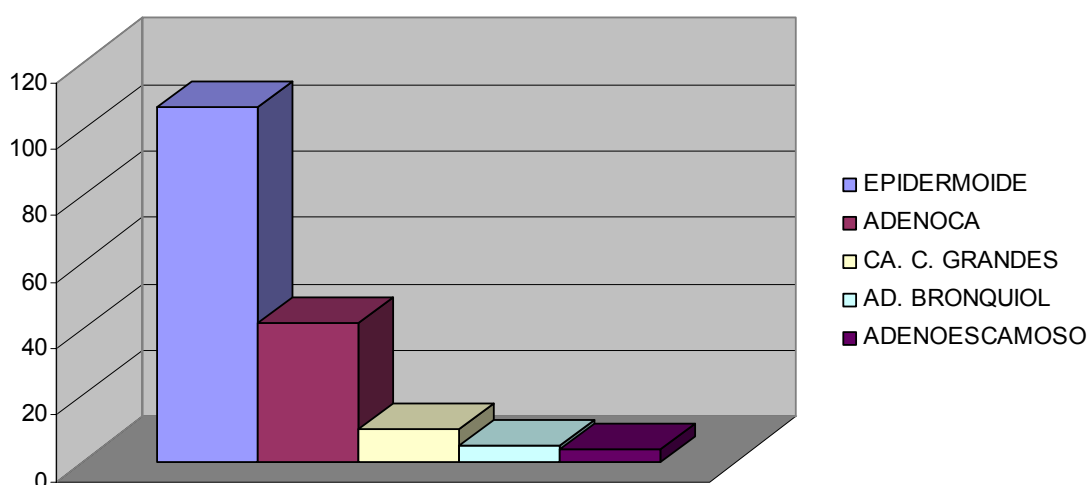


Figura 12. Distribución de la serie según el tipo histológico.

Según el grado de diferenciación, los tumores se subdividieron en: bien diferenciados en 63 casos (37,5%), moderadamente diferenciados en 64 (38,1%), pobremente diferenciados en 31 (18,5%) e indiferenciados en 10 casos (6,0%) (ver figura 13).

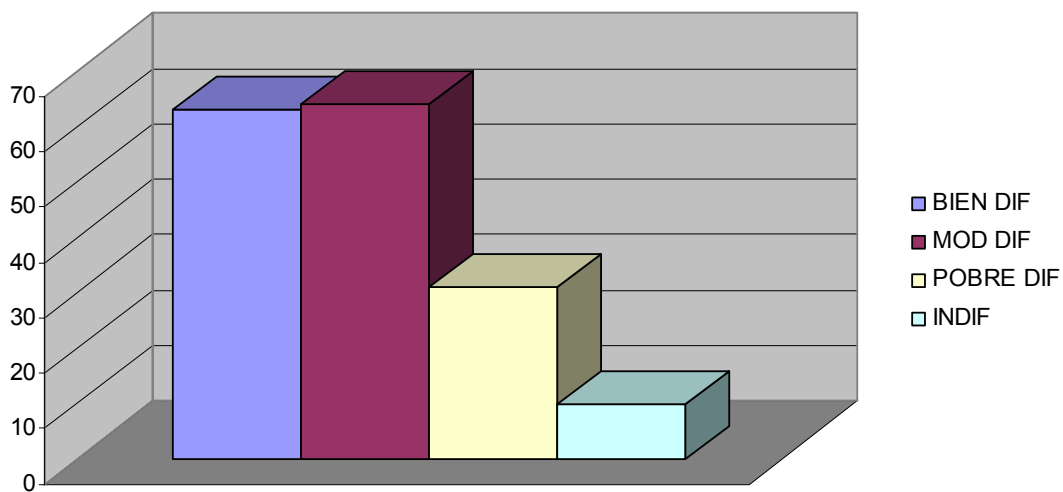


Figura 13. Distribución según el grado de diferenciación.

La distribución por estadios tumorales se realizó según la clasificación TNM de Mountain de 1997 (96), dividiéndose en (figura 14):

- Estadio I: 81 pacientes (48,2%).
- Estadio II: 46 pacientes (27,4%).
- Estadio IIIA: 36 pacientes (21,4%).

- Estadio IIIB: 5 pacientes (3,0%): tres pacientes fueron T4 por nódulos en el mismo lóbulo, uno por afectación del diafragma y uno por invasión de la carina.

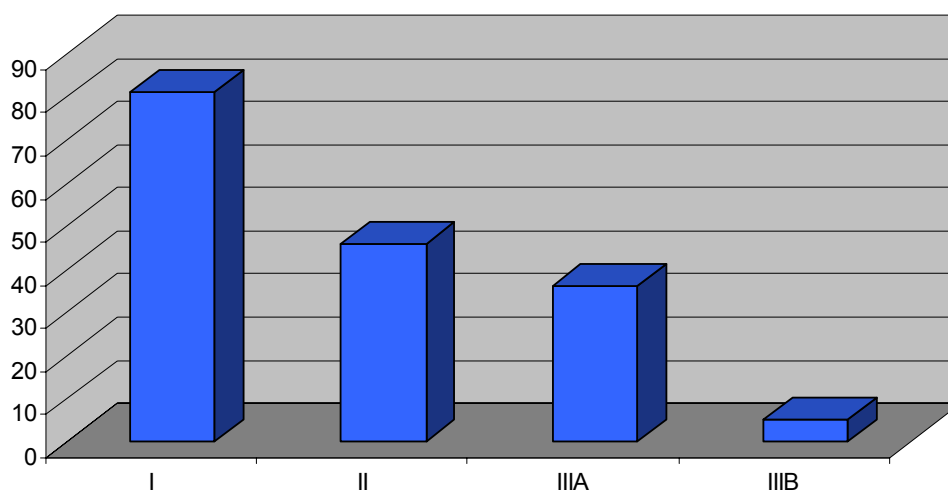


Figura 14. Estadificación TNM.

Todos los pacientes fueron sometidos a tratamiento quirúrgico, siendo las resecciones más frecuentes, la lobectomía: 96 pacientes (57,1%) y la neumonectomía: 53 (31,5%), en ambos casos con linfadenectomía mediastínica homolateral sistemática; en los demás pacientes se realizó segmentectomía: 9 pacientes (5,4%), bilobectomía: 8 (4,8%) y en dos una resección atípica (1,2%). La segmentectomía y la resección atípica se realizaron principalmente en tumores T1 y T2 N0 M0, y/o en pacientes con función pulmonar limitada que no podían tolerar una resección mayor.

Tras la intervención quirúrgica se indicó tratamiento adyuvante con quimioterapia (QT) en 14 pacientes (8,3%), con radioterapia (RT) en 54 (32,1%) y en 10 pacientes (5,4%) ambas. De los tratados con QT: 2 en el estadio IB, 4 en el IIB y 8 en el IIIA. En los tratados con RT: 25 en el IIB y 29 en el estadio IIIA. En los tratados con QT+RT: 2 del estadio IIB y 8 en el IIIA.

III.2.- MÉTODOS

METODOLOGÍA CLÍNICA:

La recogida de datos se realizó en tres momentos del estudio; los primeros previamente a la intervención quirúrgica, luego durante el periodo postoperatorio inmediato y por último durante el seguimiento de los pacientes.

1.- Fase preoperatoria:

Previamente a la cirugía, se realizó a todos los pacientes un estudio diagnóstico para determinar su estado general (preoperatorio, preanestesia y pruebas funcionales respiratorias) y su diagnóstico de cáncer de pulmón.

Los pacientes que presentaban alguno de los criterios de exclusión definidos previamente fueron eliminados del estudio.

Se procedió a la extracción de una muestra de sangre (10 c.c.) en todos los pacientes incluidos. La extracción se realizó por la mañana (8-9 a.m.) previo a cualquier tratamiento médico-quirúrgico, encontrándose el paciente en ayunas. Se determinaron en estos sueros los marcadores tumorales del estudio: el CEA y el CA 12.5.

2.- Fase operatoria:

Durante el acto quirúrgico se extrajeron dos muestras de tejido de cada paciente: una de tejido tumoral y otra de tejido pulmonar sano separada al menos 10 cm. del borde del tumor, siempre que fuera posible. Las muestras fueron lavadas con abundante suero fisiológico con objeto de limpiar los restos de sangre y moco y se eliminó la grasa. Una vez identificadas adecuadamente, se introdujeron en un bote de plástico y se

congelaron introduciéndolas en un termo con nitrógeno líquido, no sobrepasando nunca los cinco minutos entre la extracción y el momento de la congelación. A continuación las piezas se depositaban en un congelador a -80°C , hasta su procesamiento definitivo. Estas muestras fueron analizadas posteriormente en un mismo centro.

3.- Fase postoperatoria:

Para analizar la posible influencia pronóstica del análisis de los marcadores tumorales elegidos, se confeccionó una hoja de reclutamiento y otra de seguimiento:

A.- Hoja de reclutamiento:

Se dividió en varios apartados:

- Centro Hospitalario.
- Datos personales del paciente: se registraron su nombre, dirección, edad y sexo.
- Datos quirúrgicos: recogiendo la fecha de la intervención y el tipo de cirugía.
- Datos anatomopatológicos: el tamaño (en centímetros), la localización del tumor, el tipo histológico, la afectación ganglionar y el grado de diferenciación del mismo.
- Clasificación tumoral por estadios (TNM - Mountain 1997).
- Tratamiento adyuvante con RT y/o QT.

B.- Hoja de seguimiento:

Se realizó el seguimiento mediante revisiones periódicas cada 3 meses los dos primeros años y cada 6 a partir del tercero.

Durante el seguimiento se realizó un examen clínico, un análisis básico y una determinación de marcadores tumorales séricos. Como exámenes complementarios se realizaron una radiografía de tórax alternando con TAC cada 3 meses los dos primeros años y cada seis meses hasta finalizar el seguimiento. Se completó con broncoscopia cuando existía sospecha de recidiva.

En esta hoja de seguimiento se anotaron:

- Fecha de visita.
- Exploración física.
- Análisis y marcadores tumorales.
- Radiografía de tórax.
- Resultados de TAC y broncoscopia.
- Recidiva: anotando el tipo (recidiva local y/o metástasis), su localización, fecha de sospecha, técnica diagnóstica de confirmación y su tratamiento si existió (cirugía, RT y/o QT).

Se consideró como recidiva locorregional la presencia de lesiones tumorales en el mismo pulmón y/o la presencia de enfermedad ganglionar en el mediastino homolateral. Se definió como metástasis a la aparición de enfermedad tumoral en el pulmón y/o en el mediastino contralateral y/o las lesiones en otros órganos con el mismo diagnóstico anatomopatológico.

- Fecha y causa de defunción. Se definió como muerte en nuestro estudio al fallecimiento del paciente por causas relacionadas con el proceso neoplásico pulmonar.

METODOLOGÍA ANALÍTICA:

1.- Estudio histopatológico:

El estudio anatomopatológico se realizó por un mismo patólogo especialmente para este estudio. El análisis histológico de los carcinomas broncogénicos resecados con intención curativa comenzó con el estudio macroscópico de la pieza y la selección de las muestras para la microscopía óptica, incluyendo al menos dos cortes de la masa tumoral. Los ganglios linfáticos y áreas de posible infiltración se seleccionaron de forma individualizada. La muestra destinada al estudio histopatológico fue fijada inmediatamente en formol al 10% durante 12 horas, incluida en parafina y teñida con la técnica convencional de Hematoxilina-eosina.

En cada tumor se determinó el tamaño, tipo histológico (clasificación de la OMS de 1999) (32), el grado de diferenciación y el estadio tumoral (según la clasificación de Mountain de 1997).

2.- Determinaciones séricas (CEA y CA 12.5):

Se procedió a la extracción de una muestra de sangre venosa con sistema de vacío de aproximadamente 10 cc., que fue transferida a un tubo de vidrio; tras lo cual se centrifugó a 3000 r.p.m. para obtener el suero. De estas muestras de suero se separaron tres alícuotas que se conservaron hasta su procesamiento a 4° C.

En el laboratorio central se analizaron las concentraciones séricas preoperatorias de CEA y CA12.5. Para su determinación se empleó el test CEA y el test CA 12.5 (Cobas Core EIA, Roche Diagnostics GMBH, Mannheim, Germany). Consisten en un

enzimoinmunoanálisis en fase sólida basado en el sistema de doble anticuerpo "sandwich" con dos anticuerpos monoclonales de ratón altamente específicos, contra CEA ó CA 12.5.

Las muestras, controles y standards se incuban en una sola etapa con bolas cargadas de anticuerpos monoclonales anti-CEA ó anti-CA 12.5 (M-II) de ratón y un segundo anticuerpo monoclonal anti-CEA ó anti-CA 12.5 (OC 12.5) de ratón fijado de forma covalente a peroxidasa de rábano picante. Durante la incubación, los marcadores reaccionan simultáneamente con el anticuerpo fijado a la bola y con el conjugado, formando así un complejo "sandwich". Tras el lavado, las bolas se incuban con una solución de sustrato enzimático. La coloración resultante es una medida directa de la peroxidasa anti-CEA ó anti-CA 12.5 fijada. La intensidad de la coloración producida por la reacción enzimática es proporcional a la concentración de CEA ó de CA 12.5 de las muestras.

Los reactivos empleados son:

- 50 µl muestra.
- 50 µl calibradores de concentraciones de CEA: 0, 2.5, 5, 10, 20 y 50.
- 50 µl calibradores de concentraciones conocidas de CA 12.5: 0,60,180 y 540 U/ml.
- 50 µl control.
- 1 esfera recubierta de anticuerpo monoclonal anti-CEA de ratón ó anti-CA 12.5 II de ratón.
- 200 µl conjugado anti CEA ó anti CA 12.5 II monoclonal de ratón.
- 250 µl (CEA) ó µl (CA 12.5) de solución sustrato.
- 1 ml ácido sulfúrico.

El ensayo consiste en:

- 1° Calentar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente mezcladas bien.
- 2° Preparar los tubos por duplicado y añadir 50 µl de muestra, control y standard.
- 3° Añadir 200 µl de conjugado anti-CEA ó anti CA 12.5 II.
- 4° Añadir una esfera recubierta de anti-CEA ó anti CA 12.5 II.
- 5° Incubar a 37°C en agitación durante 30 minutos.
- 6° Lavar los tubos con las esferas con 3-5 ml. de agua destilada ó desionizada.
- 7° Añadir 250 µl (CEA) ó µl (CA 12.5) de solución sustrato a todos los tubos.
- 8° Incubar a 37°C durante 15 minutos protegiéndolas de la luz directa en placa de agitación.
- 9° Detener la reacciones añadiendo 1 ml. de ácido sulfúrico a cada tubo.
- 10° Mezclar bien y medir en un fotómetro a 450 nm. las absorbancias de los controles.
Detener la reacciones añadiendo 1 ml. de ácido sulfúrico a cada tubo.
- 11° Construir la curva standard, registrando las absorbancias de los standards de CEA ó de CA 12.5 II en función de las concentraciones conocidas de ellas.

CEA: si el valor es superior a 50 µl, ésta se diluye con standard cero y se repite la determinación multiplicando su resultado por el factor de dilución utilizado.

CA 12.5: si el valor de una muestra fue superior a 540 U/ml, ésta se diluye con standard cero y se repitió la determinación multiplicando su resultado por el factor de dilución utilizado.

Los resultados obtenidos de CEA se calcularon en ng/ml y el punto de corte (cut-off) empleado en el estudio fue de 5 ng/ml.

Los resultados obtenidos de CA 125 se calcularon en U/ml y el punto de corte empleado (cut-off) fue de 15 U/ml (154).

3.- Determinaciones tisulares (oncogenes p53 y c-erbB-2):

Las muestras obtenidas de tejido durante la intervención quirúrgica fueron analizadas por un especialista específico para el estudio. Las alteraciones en los oncogenes p53 y c-erbB2 se estudiaron determinando la sobreexpresión de las proteínas codificadas por los mismos, es decir, las proteínas p53 y p185, empleando un método inmunohistoquímico.

Las técnicas inmunohistoquímicas permiten la identificación de un constituyente de la célula ó del tejido *in situ* mediante una reacción inmunológica en la que la molécula a localizar actúa como antígeno en la reacción.

A.-) El procedimiento que hemos seguido en este estudio fue el siguiente:

Se emplearon las muestras de tumor incluidas en parafina recogidas durante el acto quirúrgico. De cada bloque seleccionado se realizaron cortes de tres micras de grosor, inmediatamente antes de iniciar la técnica fue necesario desparafinarlos e hidratarlos. Para mejorar la tinción, las muestras se trataron previamente en un horno de cocción hirviendo durante 5 minutos a una temperatura superior a 130°C. Posteriormente se realizó la incubación de los cortes histológicos con el anticuerpo primario correspondiente, para la proteína p53 (DO7; Biogenex) ó para la proteína p185 (Her-2/neu, clon CB11; Biogenex). El complejo antígeno-anticuerpo se visualizó

utilizando la técnica de coloración streptavidina-biotina-fosfatasa alquil (Kit Mlink, MD) y Fast Red como cromógeno. Se empleó la hematoxilina como contratinción de los cortes y la elaboración de las muestras fue llevada a cabo utilizando OPTIMA PLUS v 2.7 (Menarini Diagnostics). Las preparaciones fueron evaluadas al microscopio (LLABORLUX 12; Leitz) por un único patólogo, el cual desconocía los datos clínicos de los pacientes.

B.-) Valoración de los resultados:

La tinción inmunohistoquímica se evaluaba por la coloración parduzca observada en las células neoplásicas.

1.- Sobreexpresión de p53: se realiza una valoración semicuantitativa de los resultados obtenidos y se considera el porcentaje de núcleos teñidos de la siguiente forma:

- 0 = 0-5 %.
- '' + '' = 5-40 %.
- '' ++'' = 40-70 %.
- '' +++ '' = > 70 %.

Como controles positivos se utilizaron muestras de positividad conocida, empleando cortes histológicos de un adenocarcinoma de colon.

2.- Sobreexpresión de p185: se realiza una valoración semicuantitativa de los resultados obtenidos y se considera el porcentaje de membrana completa teñida de la siguiente manera:

- 0 = 0-5 %.
- '' + '' = 5-40 %.
- '' ++'' = 40-70 %.
- '' +++ '' => 70 %.

Como controles positivos se utilizaron muestras de positividad conocida, empleando cortes histológicos de un adenocarcinoma de mama.

METODOLOGÍA ESTADÍSTICA:

El diseño del trabajo es el de un estudio multicéntrico de cohortes prospectivo. La población diana son los 168 pacientes del estudio.

Las variables cualitativas se presentan con su distribución de frecuencias. Las variables cuantitativas se resumen en su media y desviación estándar (DE).

Se obtuvieron los porcentajes de los cuatro marcadores (niveles séricos de CEA y CA 125, y las concentraciones tisulares de las proteínas p185 y p53) y se realizó la comparación entre la prevalencia de las alteraciones y las distintas variables clínicas cualitativas. Se evaluó la asociación entre variables cualitativas con el test de χ^2 de Pearson ó prueba exacta de Fisher, en el caso de que más de un 25% de los esperados fueran menores de 5. En el caso de variables ordinales se contrastó la hipótesis de tendencia ordinal de proporciones.

Se estimaron las funciones de supervivencia por el método de Kaplan-Meier para las variables independientes para el estudio de los eventos: muerte y recidiva. Se presentan las gráficas de las curvas estimadas y la mediana de la distribución junto a su intervalo de confianza. La comparación de las funciones de supervivencia de los distintos subgrupos se realizó mediante el test exacto de Breslow. Consiste en comparar el número de eventos observados en cada uno de los subgrupos con el número de eventos esperados en el caso de que la distribución de la variable dependiente fuera la misma en todas las categorías (hipótesis nula).

Se ajustó un modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. Este modelo permite identificar y evaluar la relación entre un conjunto de variables explicativas y el tiempo de ocurrencia de un evento (muerte y recidiva) y también predecir el tiempo de

supervivencia de un determinado sujeto a partir de los valores que toma en las variables explicativas ó pronósticas.

$$h(t; X) = h_0(t) * e^{\beta'X} = h_0(t) * e^{(\beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \dots + \beta_p x_p)}$$

$$h(t; X)$$

Tasa de riesgo de un sujeto, con valores $X=(x_1; x_2; \dots; x_p)$ en las variables explicativas, en el instante t. Es la variable respuesta que se modeliza. Representa el riesgo de fallecer (ó de perder el injerto) en el instante t, de los sujetos que tienen un determinado patrón de valores x en las variables explicativas.

$$e^{\beta'X}$$

Función exponencial, cuyo exponente es la combinación lineal, sin término constante, de las p variables explicativas X_i .

$$h_0(t)$$

Función de riesgo de referencia (“baseline” ó “underlying hazard function”), que sólo depende del tiempo, llamada así porque representa las tasas instantáneas de riesgo de un sujeto hipotético con valor 0 en todas las variables predictivas.

Se evaluó la existencia de interacciones, introduciendo las variables independientes multiplicativas con pruebas de significación estadística y se mantienen en el modelo los términos de interacción estadísticamente significativos. Se presentan las “razones de tasas” (HR) ajustadas junto a sus intervalos de confianza al 95% (IC 95%). La interpretación de los parámetros del modelo con signos positivos indica un aumento de la tasa instantánea de riesgo, es decir, un peor pronóstico del sujeto para un

valor alto de la variable x . Un parámetro β con signo negativo indica mejor pronóstico para un valor alto en la variable x . La contribución de una variable x se valora con el exponente e^{β} , que es el factor por el cual se multiplica la tasa de riesgo instantáneo de un sujeto cuando la variable x se incrementa en una unidad. Este exponente se interpreta como el riesgo relativo en el instante t de los sujetos. En variables dicotómicas es pasar de la ausencia (0) a la presencia (1) del factor x . En variables cuantitativas el incremento lineal de la tasa de riesgo cuando se incrementa la variable x en una unidad. Este aumento es proporcional en todos los valores que toma la variable. Por ejemplo la edad, el incremento ó decremento es igual de pasar de 34 a 35 años que de 50 a 51 o de 67 a 68 años. En variables policotómicas (más de dos categorías) una categoría se toma como referencia y por lo tanto el RR es de 1. El resto de las categorías se comparan frente a la de referencia.

Los supuestos básicos que deben de cumplir los datos para poder aplicar dicho modelo son sobre todo de la parte paramétrica ya que la contribución de las diferentes variables explicativas en la predicción de la supervivencia, ó más precisamente, de la tasa instantánea de riesgo, es la misma en cualquier momento de tiempo de seguimiento. La parte no paramétrica del modelo no impone ningún supuesto sobre la forma de distribución de los tiempos de supervivencia.

En todos los casos se comprobó la distribución de la variable frente a los modelos teóricos y se contrastó la hipótesis de homogeneidad de variancias.

En todos los contrastes de hipótesis se rechazó la hipótesis nula con un error de tipo I ó error α menor a 0.05.

METODOLOGÍA INFORMÁTICA:

Todos los datos fueron incluidos en una base de datos prospectiva y analizados en un ordenador personal, el paquete informático utilizado para el análisis fue SPSS para Windows versión 12.0.

IV.- RESULTADOS

IV.1.- RESULTADOS GENERALES

En el estudio se incluyeron 168 pacientes intervenidos por carcinoma no microcítico de pulmón con intención curativa.

El seguimiento mediano de los pacientes fue de 34 meses, con un rango intercuartil de 29 a 71 meses (RIQ 29-71).

Durante el seguimiento global se observaron 70 fallecidos en relación con el cáncer de pulmón (41,7%), encontrándose vivos 98 pacientes (58,3%). La supervivencia global a los 48 meses, realizada por el mismo método, fue del 61% (figura 15).

Se detectaron 89 casos (52,9%) de recidiva de la enfermedad, 30 pacientes (17,9%) en forma de recidiva locorregional y 59 con metástasis (35,1%). En 13 casos se apreció recidiva por ambas circunstancias (7,7%). En nuestro trabajo se englobaron las recidivas y las metástasis en un mismo grupo de análisis. Se estudió la probabilidad de permanencia libre de enfermedad que fue del 55 % a los 48 meses (figura 16).

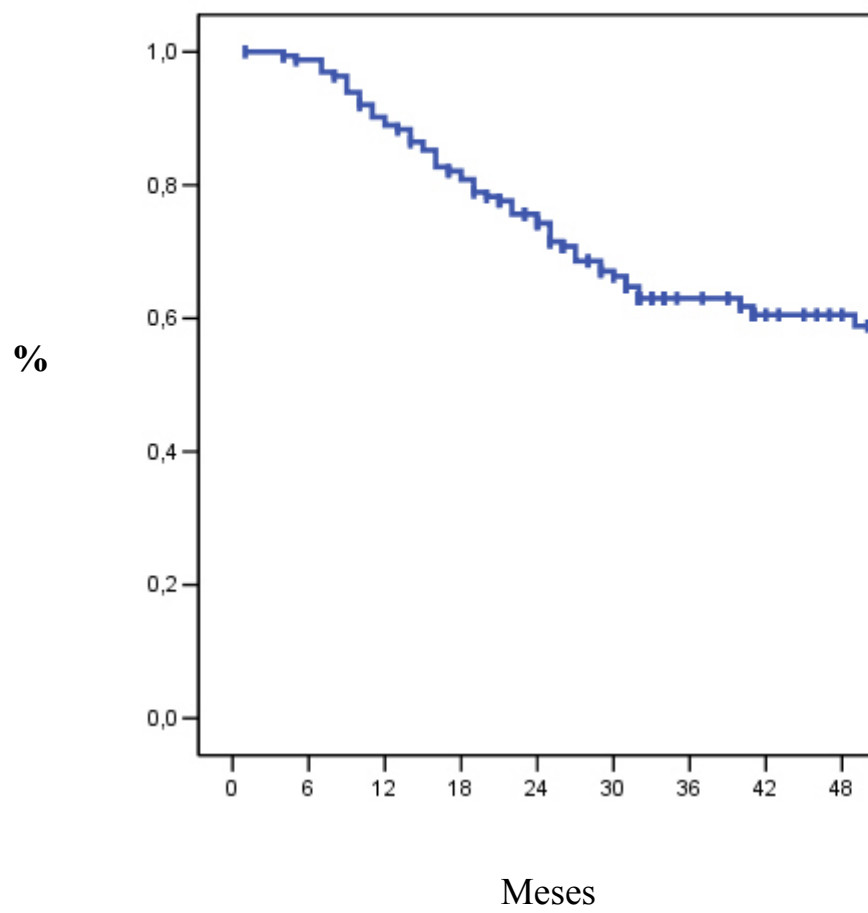


Figura 15. Supervivencia global. Curva de Kaplan-Meier.

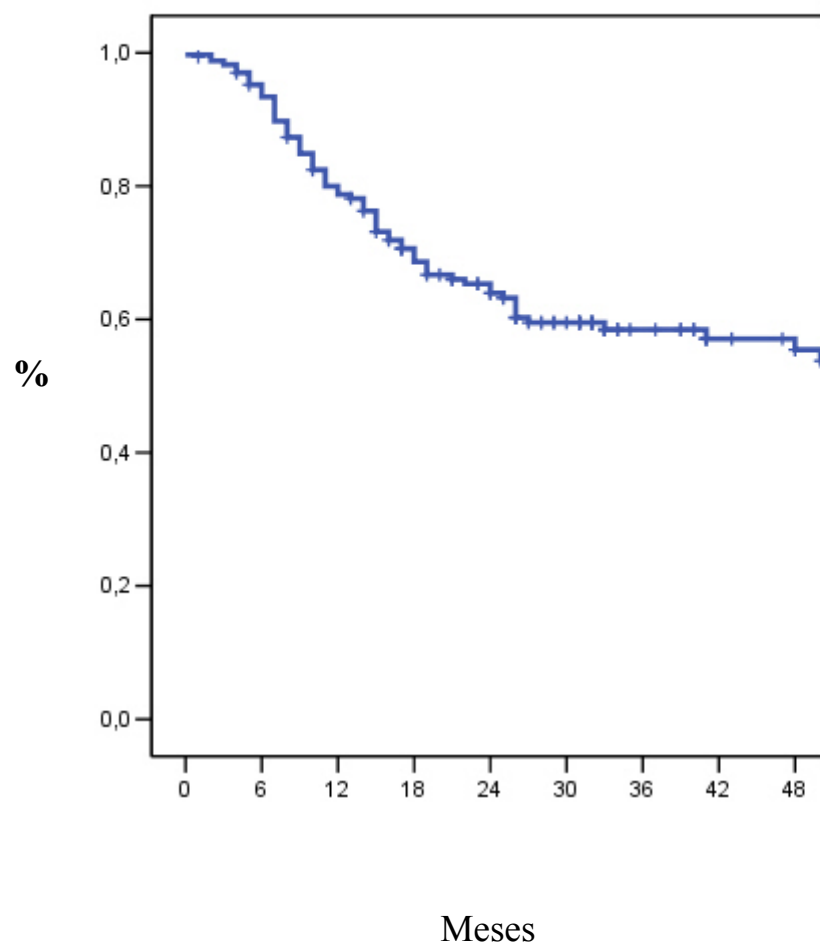


Figura 16. Intervalo libre de enfermedad. Curva de Kaplan-Meier.

IV.2.- INCIDENCIA DE LOS MARCADORES TUMORALES ESTUDIADOS

MARCADORES TUMORALES SÉRICOS:

Resultados de las determinaciones de CEA:

Los niveles séricos de CEA fueron mayores ó iguales a 5 ng/ml en 45 pacientes (27,6%) y menores en 118 casos (72,4%) (figura 17).

Resultados de las determinaciones de CA 12.5:

En relación al CA 12.5, se obtuvieron niveles séricos mayores ó iguales a 15 U/ml en 22 pacientes (14,1%) y menores en 134 (85,9%) (figura 17).

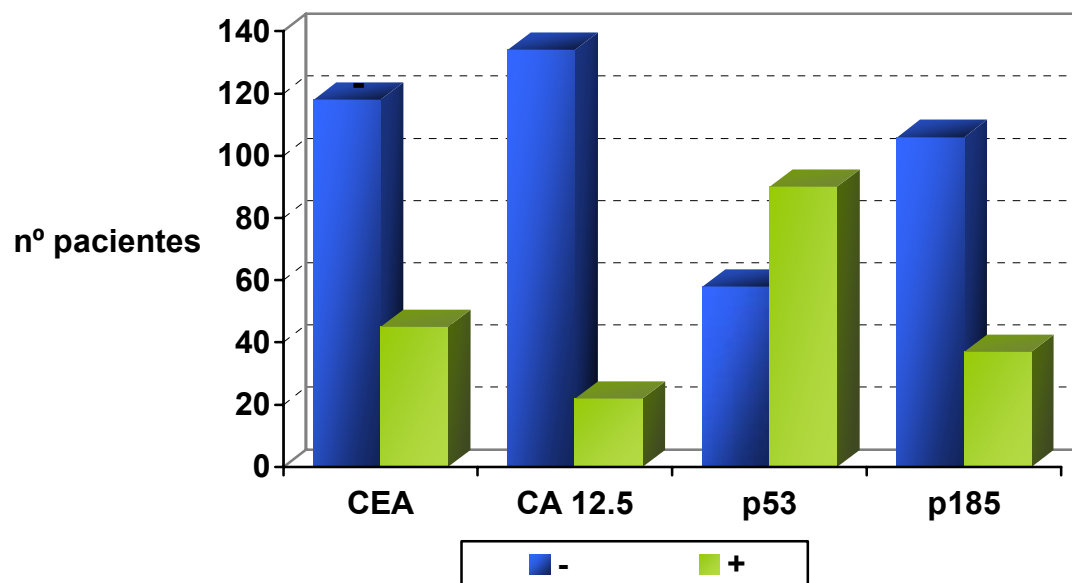
MARCADORES TISULARES:

Sobreexpresión de la proteína p-53:

El resultado de p53 resultó positivo en 90 pacientes (60,8%) y negativo en 58 (39,2%) (figura 17). Se observa que la gran mayoría (un 78,88%), presenta positividad con 3+, por lo que se decidió analizar los datos como positivo ó negativo.

Sobreexpresión de la proteína p-185:

Se presentó sobreexpresión de la proteína p185 en 37 pacientes (25,9%) y un resultado negativo en 106 casos (74,1%) (figura 17). Al analizar la postividad de p185, el 5% lo eran por 2+ ó 3 +, por lo que se decidió registrar los datos como positivo ó negativo.



CEA	<5ng/ml	118	72,4%	p53	-	58	39,2%
	≥5 ng/ml	45	27,6%		+	90	60,8%
CA 12.5	<15 U/ml	134	85,9%	p185	-	106	74,1%
	≥15 U/ml	22	14,1%		+	37	25,9%

Figura 17. Incidencia de los marcadores tumorales.

IV.3.- RELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES Y LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Se estudió la posible relación entre los marcadores y las siguientes variables clínico-patológicas: tamaño del tumor, tipo histológico, grado de diferenciación y estadio tumoral.

ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO (CEA) (ver tabla VI):

Se observó un resultado positivo del CEA (≥ 5 ng/ml) en un paciente con tamaño del tumor menor de 2 cm. (14,3%) y en 44 con tamaño mayor ó igual a dicha cifra (28,2%). No se objetiva asociación estadística entre el tamaño del tumor y las cifras del CEA ($p=0,4$).

La distribución según el tipo histológico fue: 23 pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide con cifras ≥ 5 ng/ml del CEA (22,3%), 16 adenocarcinomas (39%), 4 carcinomas de células grandes (40%), uno ad. bronquioalveolar (20%) y uno adenoescamoso (25%). No existe asociación estadística ($p=0,28$).

Según el grado de diferenciación, en el grupo de tumores bien diferenciados presentaron niveles de CEA ≥ 5 ng/ml 13 pacientes (21%), entre los moderadamente diferenciados 61 pacientes (29,5%), 10 pobremente diferenciados (33,3%) y 4 indiferenciados (40%). No presenta asociación estadística ($p=0,4$).

La distribución de los tumores según el estadio tumoral fue: 23 pacientes en estadio I con cifras de CEA ≥ 5 ng/ml (30%), 8 en estadio II (17,3%), 13 en estadio IIIA (37,1%) y uno en estadio IIIB (20%). No existiendo asociación estadística ($p= 0,2$) (figura 18). Cuando analizamos los estadios entre sí, se observa que la relación entre los estadios II y IIIA sí es estadísticamente significativa ($p< 0,05$) cuando el CEA es mayor ó igual a 5 ng/ml.

Se analizaron los pacientes en estadio IIIA en función de su afectación ganglionar. Así, se distribuyeron en dos grupos: los estadio IIIA no N2 y los pacientes en estadio IIIA por N2. Los resultados fueron, con CEA ≥ 5 ng/ml: 0 pacientes IIIA no N2 y 13 en estadio IIIA con N2 (43,3%); resultado estadísticamente significativo ($p= 0,048$) (figura 19).

Tabla VI. Relación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de CEA.

Variable	Categoría	CEA \geq 5ng/ml	%	p
Tamaño	< 2 cm.	1	14,3	0,420
	\geq 2 cm.	44	28,2	
Histología	Epidermoide	23	22,3	0,284
	Adenocarcinoma	16	39	
	Ca. cél. grandes	4	40	
	Ad. Bronq.	1	20	
	Adenoescamoso	1	25	
Grado de diferenciación	BD	13	21	0,434
	MD	18	29,5	
	PD	10	33,3	
	Ind.	4	40	
Estadio tumoral *	I	23	30	0,227
	II	8	17,3	
	IIIA	13	37,1	
	IIIB	1	20	
Estadio IIIA	N2 (-)	0	0	0,048
	N2 (+)	13	43,3	

* Estadio tumoral: II vs. IIIA (p< 0,05).

nº pacientes

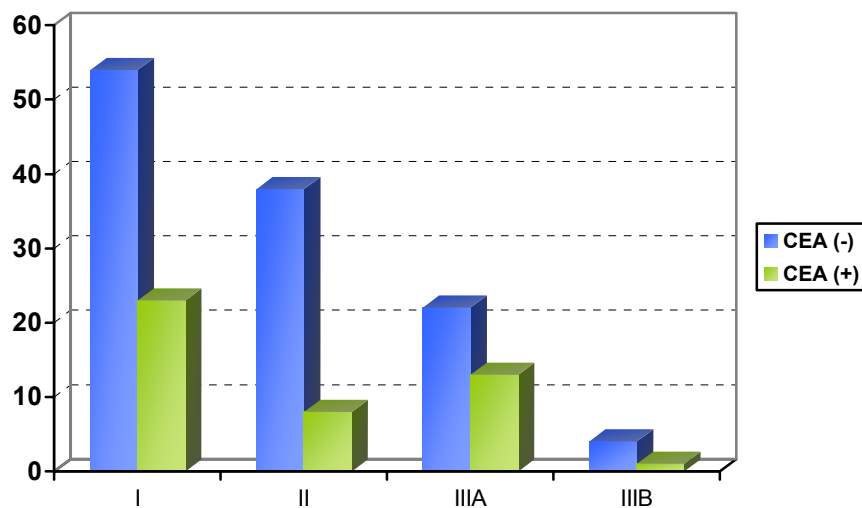


Figura 18. Relación entre el estadio tumoral y los niveles de CEA.

nº pacientes

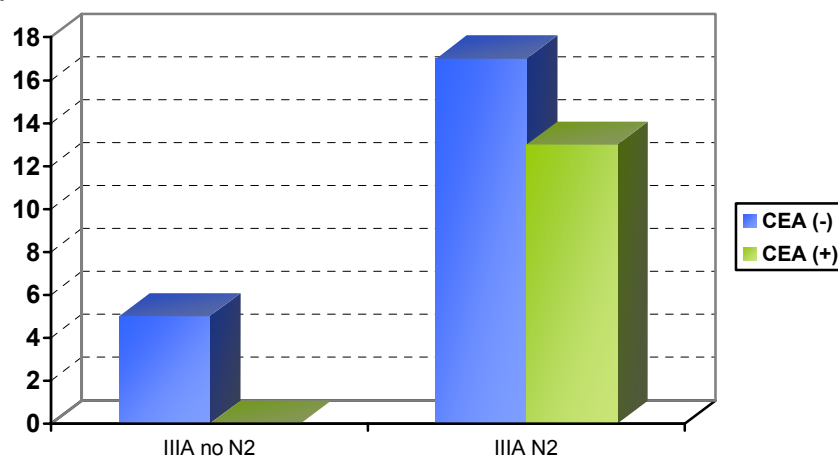


Figura 19. Relación entre el estadio tumoral IIIA y los niveles de CEA.

CARBOHIDRATO 12.5 (CA12.5) (ver tabla VII):

En cuanto al tamaño del tumor, ningún paciente con tumor menor de 2 cm. tuvo CA 12.5 ≥ 15 U/ml y entre los mayores ó iguales a 2 cm., lo presentaron 22 (14,7%). No existe asociación estadística ($p= 0,27$).

Según el tipo histológico la distribución fue: 14 tumores tipo epidermoide tuvieron cifras de CA 12.5 ≥ 15 U/ml (14,1%), 6 tipo adenocarcinoma (15,8%), uno de células grandes (10%), un paciente con ad. bronquioalveolar (20%) y ninguno dentro del grupo de adenoescamosos. No se evidencia asociación estadística ($p= 0,9$).

En cuanto al grado de diferenciación; en el grupo de los bien diferenciados 4 pacientes presentaron niveles de CA 12.5 ≥ 15 U/ml (6,4%), 9 dentro de los moderadamente diferenciados (16,3%), 8 de los pobremente diferenciados (27,6%) y uno en el grupo de los indiferenciados (10%). Existe una tendencia estadística entre el grado de diferenciación y los niveles de CA 12.5 ($p= 0,052$) (figura 20). Sin embargo, cuando se comparan entre sí los BD y los PD, existe asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Según el estadio tumoral, la distribución fue: 6 pacientes en estadio I presentaron cifras de CA 12.5 ≥ 15 U/ml (8,3%), 7 en estadio II (15,9%), 9 en estadio IIIA (25,7%) y ningún paciente en estadio IIIB. Presenta tendencia estadística ($p= 0,07$) (figura 21). Cuando analizamos entre sí los estadios I y IIIA, existe asociación estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

En cuanto al estadio IIIA: ningún paciente IIIA no N2 presentó cifras de CA 12.5 ≥ 15 U/ ml. En cambio 9 (30%) con N2 sí. Existe asociación estadística ($p= 0,017$) (Figura 22).

Tabla VII. Relación entre las variables clínico-patológicas y los niveles de CA 12.5.

Variable	Categoría	CA 12.5 \geq 15U/ml	%	p
Tamaño	< 2 cm.	0	0	0,273
	\geq 2 cm.	22	14,7	
Histología	Epidermoide	14	14,1	0,905
	Adenocarcinoma	6	15,8	
	Ca. cél. grandes	1	10	
	Ad. Bronq.	1	20	
	Adenoescamoso	0	0	
Grado de diferenciación *	BD	4	6,4	0,052
	MD	9	16,3	
	PD	8	27,6	
	Ind.	1	10	
Estadio tumoral**	I	6	8,3	0,078
	II	7	15,9	
	IIIA	9	25,7	
	IIIB	0	0	
Estadio IIIA	N2 (-)	0	0	0,017
	N2 (+)	9	30	

* Grado de diferenciación: BD vs. PD ($p < 0,05$).

** Estadio tumoral: I vs. IIIA ($p < 0,05$).

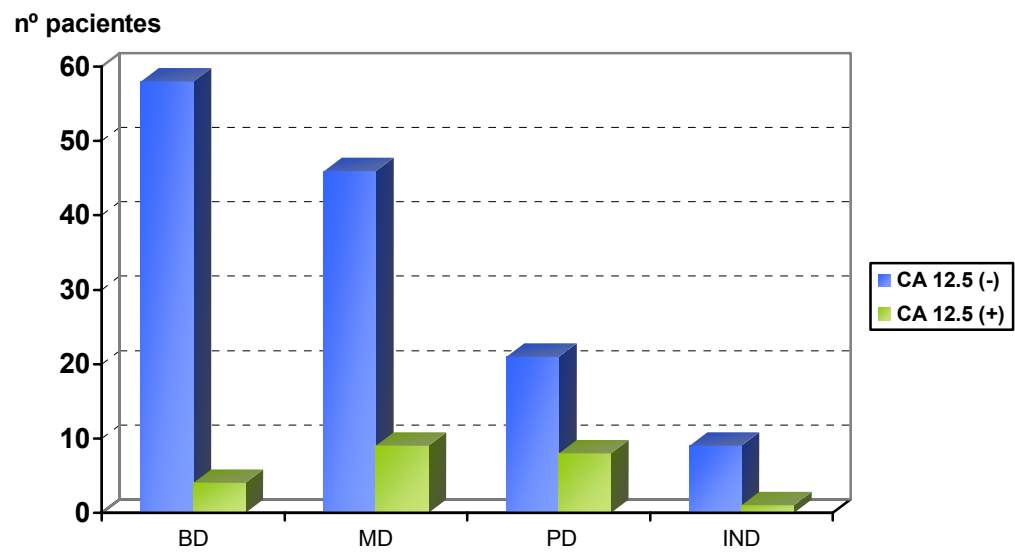


Figura 20. Relación entre el grado de diferenciación y los niveles de CA 12.5.

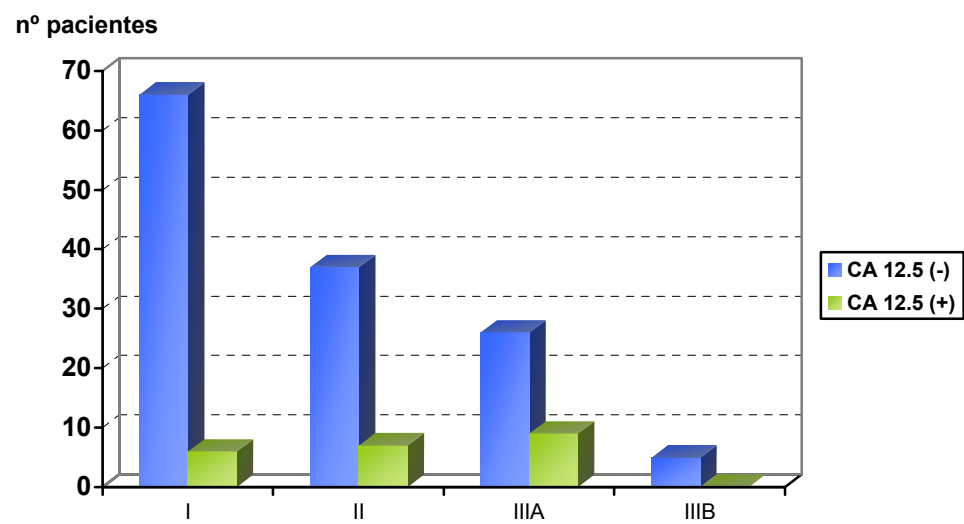


Figura 21. Relación entre el estadio tumoral y los niveles de CA 12.5.

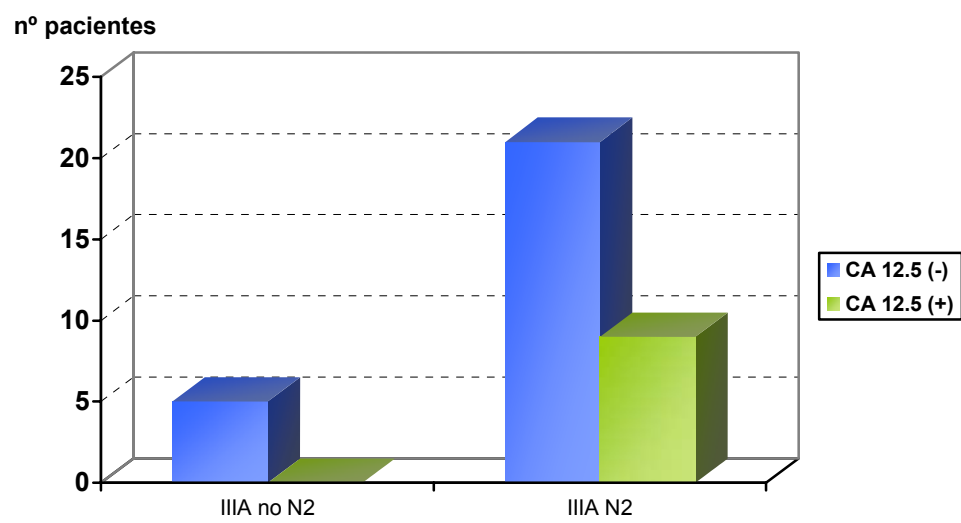


Figura 22. Relación entre el estadio tumoral IIIA y los niveles de CA 12.5.

SOREEEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P53 (ver tabla VIII):

En relación al tamaño, 4 pacientes con tumores menores de 2 cm. presentaron sobreexpresión de p53 (66,6%) y 86 con tamaño igual ó mayor (60,56%). No existe asociación estadística ($p=0,7$).

La distribución según el tipo histológico fue: 56 pacientes con tumores tipo epidermoide (59,5%) sobreexpresaron la proteína p53, 25 de los adenocarcinomas (67,56%), 5 de los tipo células grandes (50%), uno ad. bronquialveolar (25%) y 3 de los adenoescamosos (100%). Tampoco se encuentra asociación estadística ($p=0,2$).

Según el grado de diferenciación, 39 pacientes con tumores bien diferenciados sobreexpresaron la proteína p53 (65%), 33 de los moderadamente diferenciados (64,7%), 13 de los pobremente diferenciados (48,1%) y 5 de los indiferenciados (50%). Sin existir asociación estadística ($p=0,3$).

La distribución por estadio tumoral fue: 42 pacientes en estadio I presentaron sobreexpresión de la proteína p53 (58,3%), 27 de los estadio II (69,2%), 21 de los estadio IIIA (61,7%) y ninguno de los estadio IIIB la presentaron. No se evidencia asociación estadística ($p=0,1$) (figura 23).

En cuanto a la distribución del estadio IIIA, 2 pacientes no N2 presentaron sobreexpresión de la proteína (40%) y 19 con N2 (65,5%). No se encuentra asociación estadística ($p=0,5$).

Tabla VIII. Relación entre las variables clínico-patológicas y la sobreexpresión de p53.

Variable	Categoría	Sobreexpresión p53	%	p
Tamaño	< 2 cm.	4	66,6	0,764
	≥ 2 cm.	86	60,56	
Histología	Epidermoide	56	59,5	0,254
	Adenocarcinoma	25	67,5	
	Ca. cél. grandes	5	50	
	Ad. Bronq.	1	25	
	Adenoescamosos	3	100	
Grado de diferenciación	BD	39	65	0,380
	MD	33	64,7	
	PD	13	48,1	
	Ind.	5	50	
Estadio tumoral	I	42	58,3	0,111
	II	27	69,2	
	IIIA	21	67,1	
	IIIB	0	0	
Estadio IIIA	N2 (-)	2	40	0,554
	N2 (+)	19	65,5	

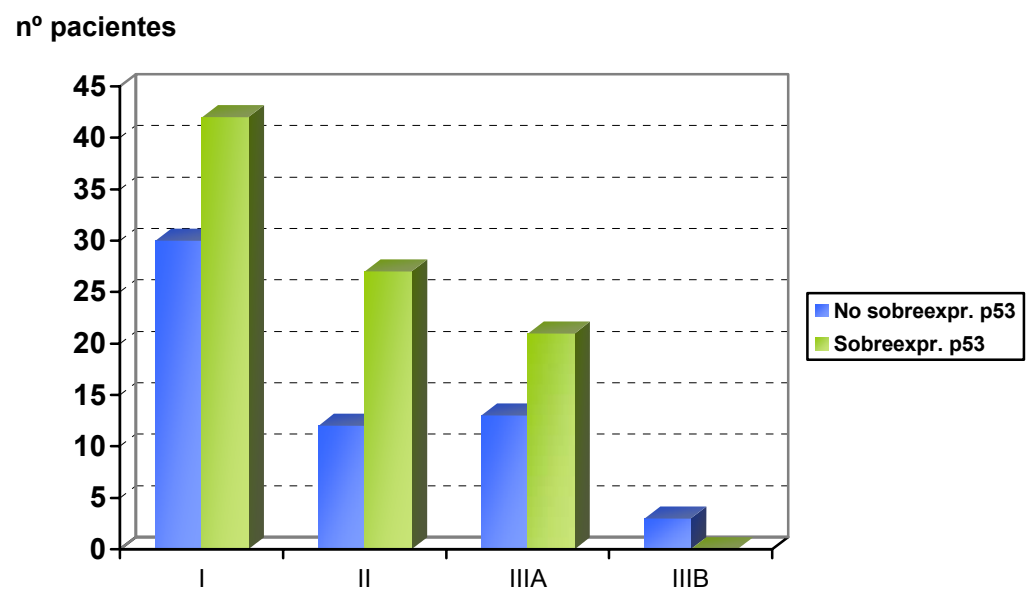


Figura 23. Relación entre el estadio tumoral y la sobreexpresión de p53.

SOBREEXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA P185 (c-Erb-2) (ver tabla IX):

Se encontró que un paciente con tumor menor de 2 cm. presentó sobreexpresión de la proteína p185 (16,6%) y 36 de los mayores ó iguales a 2 cm. (26,2%). No existe asociación estadística ($p=0,6$).

La distribución según el tipo histológico fue: 21 pacientes con tipo epidermoide (23,5%) sobreexpresaron la proteína p185, 12 de los adenocarcinomas (32,4%), uno de los de células grandes (10%), uno de los ad.bronquioalveolares (25%) y 2 de los adenoescamosos (66,6%). No se encuentra asociación estadística ($p=0,2$).

Según el grado de diferenciación, se encontró sobreexpresión de la proteína p185 en 15 pacientes de los bien diferenciados (25,8%), en 14 de los moderadamente diferenciados (29,16%), en 7 de los pobremente diferenciados (25,9%) y en uno de los indiferenciados (10%). No existe asociación estadística ($p=0,6$).

La distribución según el estadio tumoral fue: 12 pacientes en estadio I sobreexpresaron la proteína p185 (17,1%), 16 del estadio II (41%), 9 pacientes con estadio IIIA (28,1%) y ninguno del estadio IIIB. Se encuentra asociación estadística entre el estadio tumoral y la sobreexpresión de la proteína p185 ($p=0,04$). Cuando se analizan entre sí, se observa que esta asociación se debe a los estadios I y II (figura 24).

En relación al estadio IIIA, 1 paciente no N2 presentó sobreexpresión de la proteína p185 (25%) y 8 pacientes N2 (28,5%). No se encuentra asociación estadística ($p=0,9$).

Tabla IX .Relación entre las variables clínico-patológicas y la sobreexpresión de p185.

Variable	Categoría	Sobreexpresión p185	%	p
Tamaño	< 2 cm.	1	16,6	0,599
	≥ 2 cm.	36	26,2	
Histología	Epidermoide	21	23,5	0,288
	Adenocarcinoma	12	32,4	
	Ca. cél. grandes	1	10	
	Ad. Bronq.	1	25	
	Adenoescamoso	2	66,6	
Grado de diferenciación	BD	15	25,8	0,663
	MD	14	29,16	
	PD	7	25,9	
	Ind.	1	10	
Estadio tumoral*	I	12	17,1	0,041
	II	16	41	
	IIIA	9	28,1	
	IIIB	0	0	
Estadio IIIA	N2 (-)	1	25	0,936
	N2 (+)	8	28,5	

*Estadio tumoral: I vs. II (p< 0,05).

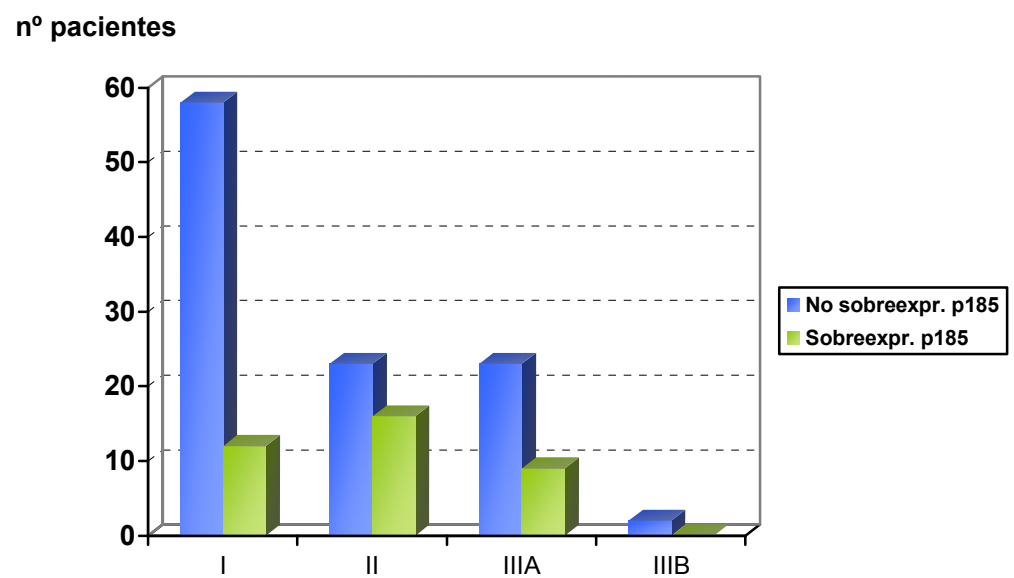


Figura 24. Relación entre el estadio tumoral y la sobreexpresión de p185.

IV.4.- SUPERVIVENCIA E INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD

Se analizó inicialmente la supervivencia e intervalo libre de enfermedad en relación con las diferentes variables clínico-patológicas y marcadores del estudio, y posteriormente se observó la supervivencia e intervalo libre de enfermedad relacionando cada uno de los marcadores con las diferentes variables clínico-patológicas.

La supervivencia global, a los 12, 24, 36 y 48 meses, fue de un 89%, 74%, 63% y un 61% respectivamente (ver tabla X).

El intervalo libre de enfermedad fue del 79% a los 12 meses, del 64% a los 24, del 58% a los 36 y del 55% a los 48 meses (ver tabla XI).

Tabla X. Porcentaje global de supervivencia en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses.				
GLOBAL	12meses n pr (EE)	24meses n pr (EE)	36meses n pr (EE)	48meses n pr (EE)
	146 89% (2,4)	112 74% (3,4)	55 63% (4,0)	37 61% (4,2)

Tabla XI. Porcentaje global de intervalo libre en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses.				
GLOBAL	12meses n pr (EE)	24meses n pr (EE)	36meses n pr (EE)	48meses n pr (EE)
	130 79% (3,2)	93 64% (3,8)	47 58% (4,0)	35 55% (4,3)

Pr: % libre de recidiva
EE: Error estándar

A.-) SUPERVIVENCIA EN RELACION CON LAS DIFERENTES VARIABLES CLINICO-PATOLOGICAS Y MARCADORES:

Variables clínico-patológicas (ver tabla XII):

En cuanto al tamaño del tumor, la supervivencia de los menores de 2 cm. fue del 83% a los 48 meses, y del 59% en los mayores ó iguales. Se observa una tendencia estadística aunque sin llegar a la significación ($p=0,06$) (figura 25).

En relación al tipo histológico, los tumores epidermoides tuvieron una supervivencia a los 48 meses del 61%, los adenocarcinomas del 58%, los de células grandes del 67%, los ad. bronquioalveolares del 100%, y el grupo de los adenoescamosos del 0%. Existe relación pronóstica en función del tipo histológico, con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,02$) (figura 26).

Según el grado de diferenciación, la supervivencia a los 48 meses, fue: en los tumores bien diferenciados del 75%, en los moderadamente diferenciados del 54%, en los pobremente diferenciados del 48%, y en los indiferenciados del 67%. No existe diferencia significativa ($p=0,2$).

La supervivencia a los 48 meses según el estadio tumoral fue: 72% en los estadio I, un 65% en los estadio II, un 34% en los estadio IIIA y un 0% en los estadio IIIB. Existe relación pronóstica entre el estadio tumoral y la supervivencia con significación estadística ($p<0,001$) (figura 27).

En relación al tratamiento adyuvante con radioterapia (RT), la supervivencia a los 48 meses resultó del 69% en los no tratados con RT y del 44% en los que lo habían sido ($p=0,005$) con asociación estadísticamente significativa (figura 28). Analizando los

datos por estadio tumoral se observa que en el estadio II la supervivencia es menor en los tratados con RT, sin embargo se invierte la tendencia en el estadio IIIA (ver figura 29).

Respecto al tratamiento adyuvante con quimioterapia (QT), la supervivencia a los 48 meses del 60% en los no tratados con QT y del 69% en los sí tratados ($p=0,3$) (figura 30). Al analizar los resultados por estadios tumorales se observa que la mejoría en la supervivencia tras tratamiento con QT se produce en ambos estadios, II y IIIA (figura 31).

Tabla XII. Porcentaje de supervivencia en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses para las distintas variables clínico-patológicas.						
MARCADORES	12meses n pr (EE)	24meses n pr (EE)	36meses n pr (EE)	48meses n pr (EE)	P	HR IC95%
GLOBAL	146 89% (2,4)	112 74% (3,4)	55 63% (4,0)	37 61% (4,2)		
Tamaño < 2 cm.	9 100% (-)	8 100% (-)	2 83% (15,2)	1 83% (15,2)	0,064	1
Tamaño ≥ 2 cm.	136 88% (2,6)	104 73% (3,6)	53 62% (4,1)	36 59% (4,3)		4,24 (0,59-30,61)
Epidermoide	96 92% (2,6)	73 76% (4,2)	33 63% (5,0)	26 61% (5,2)	0,027	1
Adenocarcinoma	33 78% (6,4)	27 68% (7,2)	17 62% (7,8)	9 58% (8,3)		1,28 (0,73-2,23)
Carcinoma de Células Grandes	10 90% (9,4)	8 90% (9,4)	1 67% (15,5)	0 67% (15,5)		0,96 (0,29-3,11)
Adenoca. Bronquioalveolar	4 100% (-)	4 100% (-)	4 100% (-)	2 100% (-)		Indeterminado
Adenoescamoso	3 100% (-)	0 0% (0)	0 0% (0)	0 0% (0)		6,42 (1,92-21,44)
Bien diferenciado	56 89% (4,0)	48 80% (5,0)	15 75% (5,6)	10 75% (5,6)	0,233	1
Moderadamente diferenciado	57 91% (3,7)	41 76% (5,5)	29 59% (6,6)	19 54% (6,7)		1,62 (0,89-2,96)
Pobrememente diferenciado	23 86% (6,7)	15 52% (9,6)	10 48% (9,7)	9 48% (9,7)		1,99 (0,98-4,06)
Indiferenciado	10 90% (9,5)	8 90% (9,5)	1 67% (15,5)	0 67% (15,5)		1,25 (0,36-4,27)

Estadio I	77 94% (2,7)	60 85% (4,0)	31 77% (4,9)	21 72% (5,8)	<0,001	1
Estadio II	37 88% (4,9)	30 73% (6,9)	17 65% (7,7)	10 65% (7,7)		1,67 (0,87-3,23)
Estadio IIIA	30 83% (6,4)	21 57% (8,4)	6 34% (8,6)	5 34% (8,6)		3,38 (1,85-6,16)
Estadio IIIB	2 50% (25)	1 25% (22)	0 0% (0)	0 0% (0)		6,96 (2,37-20,46)
No Radioterapia postoperatoria	101 91% (2,7)	80 79% (4,0)	44 72% (4,5)	32 69% (4,9)	0,005	0,47 (0,29-0,79)
Radioterapia postoperatoria	45 85% (5,0)	32 65% (6,7)	11 44% (7,4)	5 44% (7,4)		1
No Quimioterapia postoperatoria	132 88(2,7)	102 76% (3,6)	48 62% (4,2)	32 60% (4,5)	0,314	1,63 (0,59-4,48)
Quimioterapia postoperatoria	14 100% (-)	10 77% (11,7)	7 69% (12,8)	5 69% (12,8)		1

Pr: % libre de recidiva

EE: Error estándar

HR: Razon de tasas:

- HR>1: favorece el evento “aparición de cáncer de pulmón”.
- HR<1: previene el evento “aparición de cáncer de pulmón”. Factor protector.

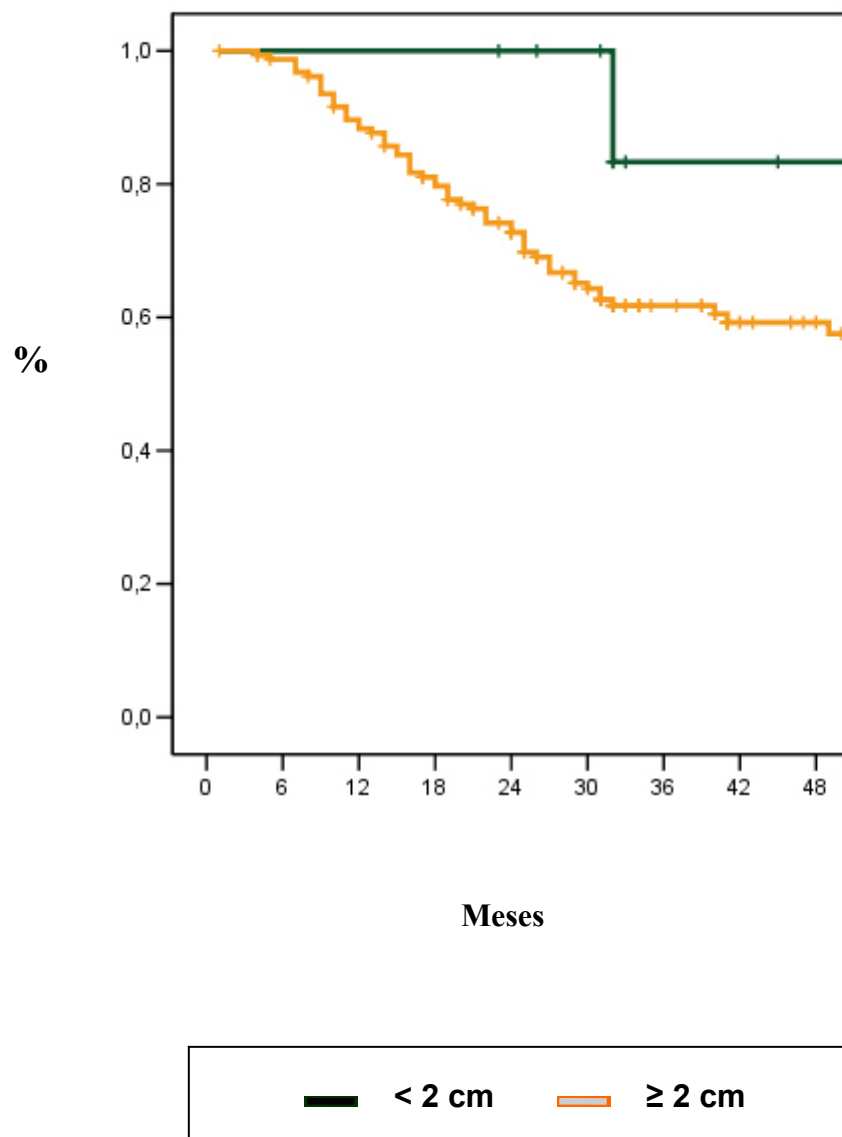
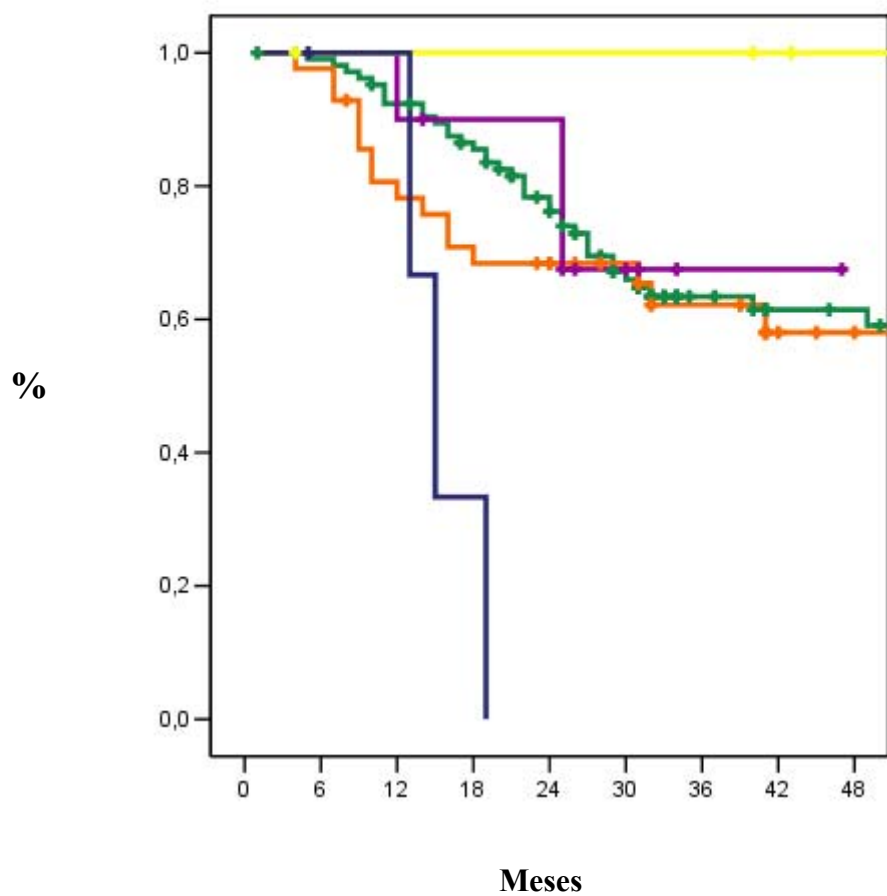


Figura 25. Supervivencia según el tamaño tumoral.



— Epidermoide	— Ca. células grandes
— Adenocarcinoma	— Ad. Bronquioalveolar
— Adenoescamoso	

Figura 26. Supervivencia según el tipo histológico.

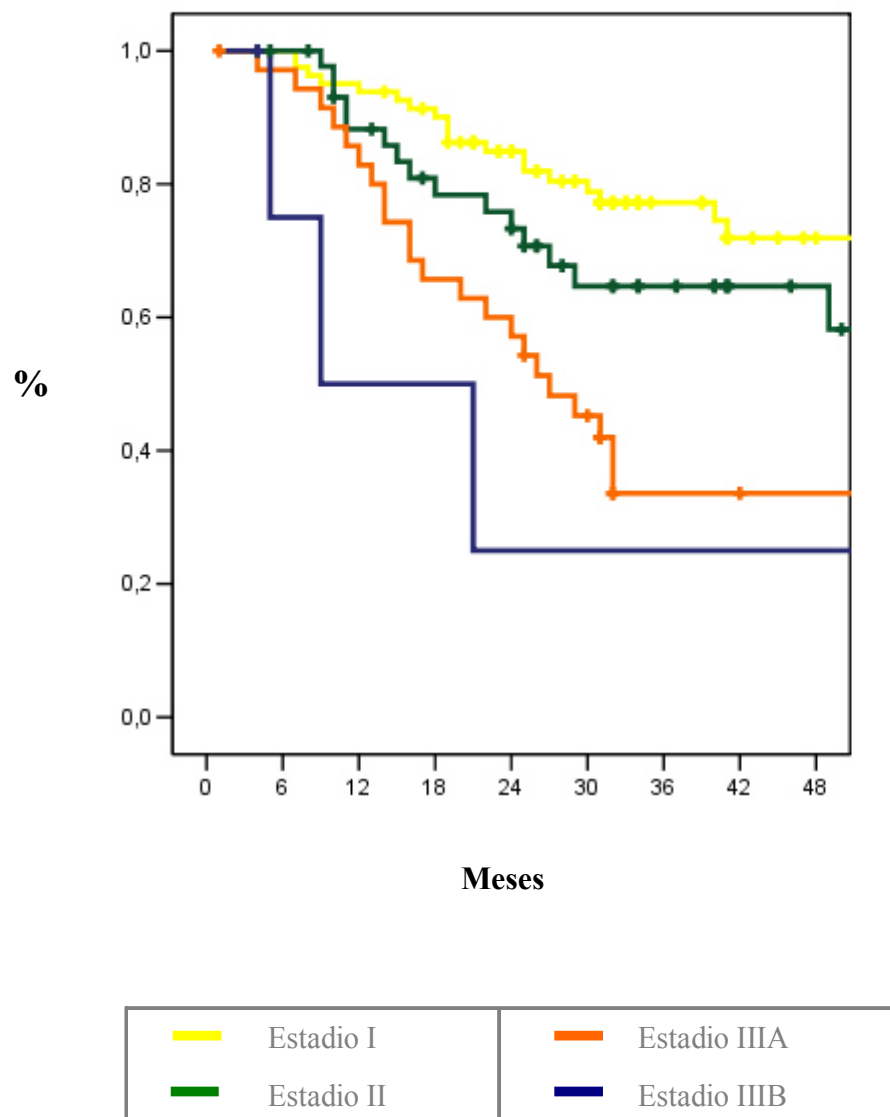


Figura 27. Supervivencia según el estadio tumoral.

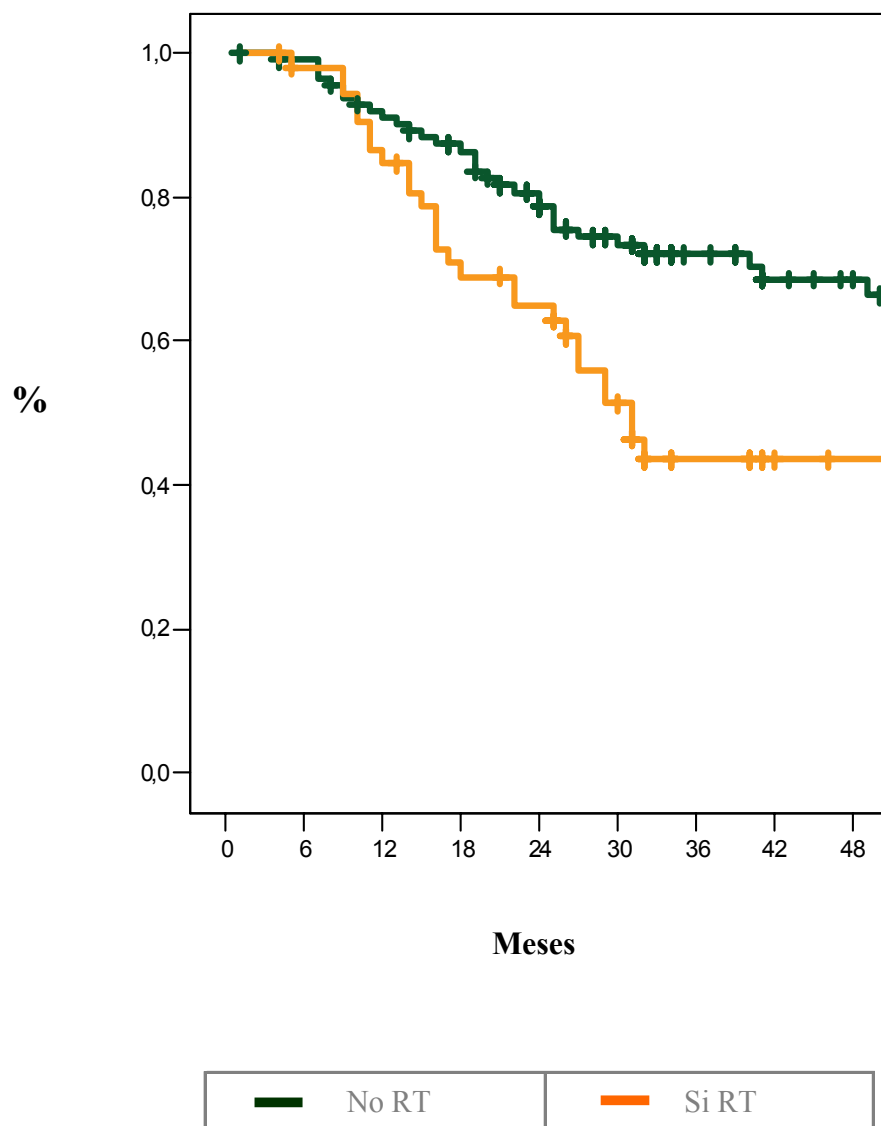
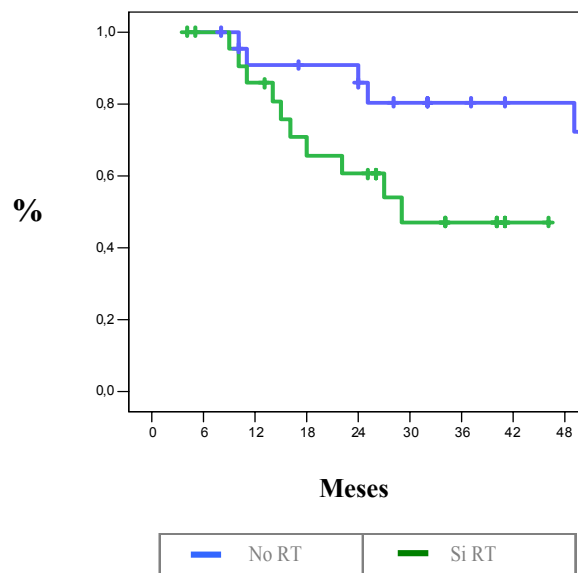
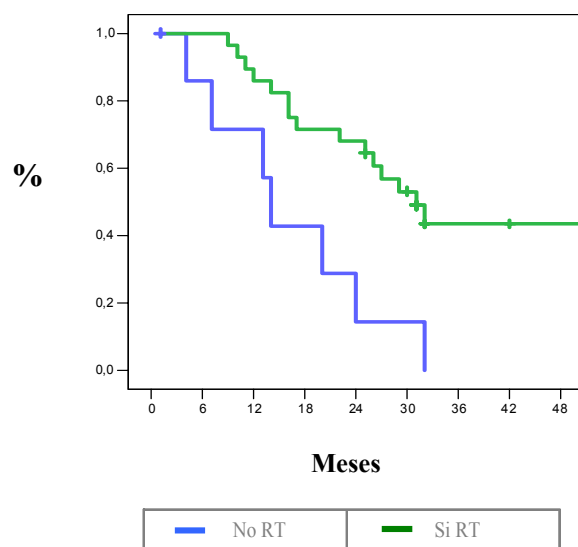


Figura 28. Supervivencia global en pacientes tratados con radioterapia adyuvante.



Estadio tumoral II.



Estadio tumoral IIIA.

Figura 29. Supervivencia por estadios en pacientes con radioterapia adyuvante.

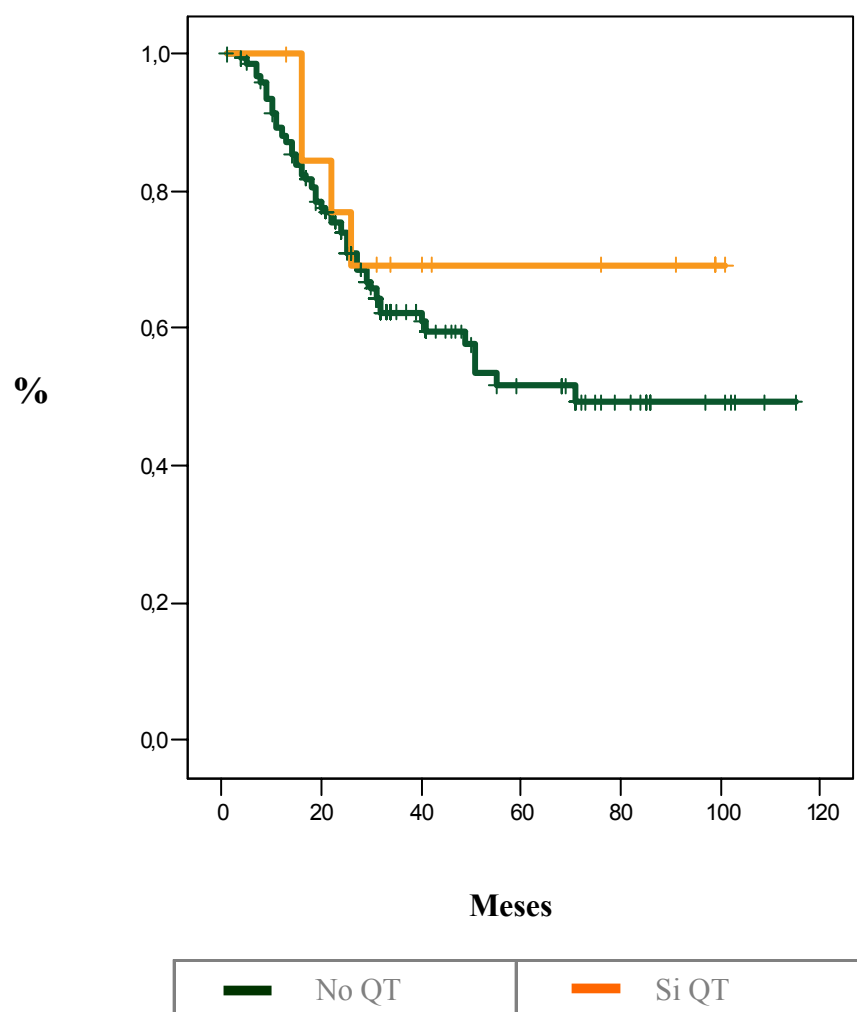
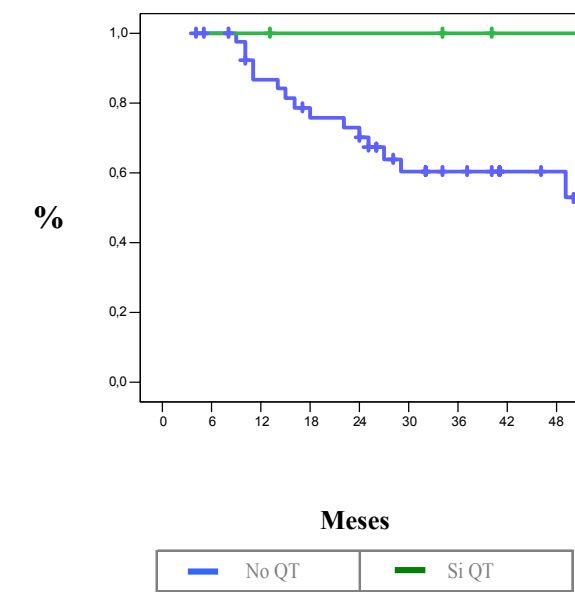
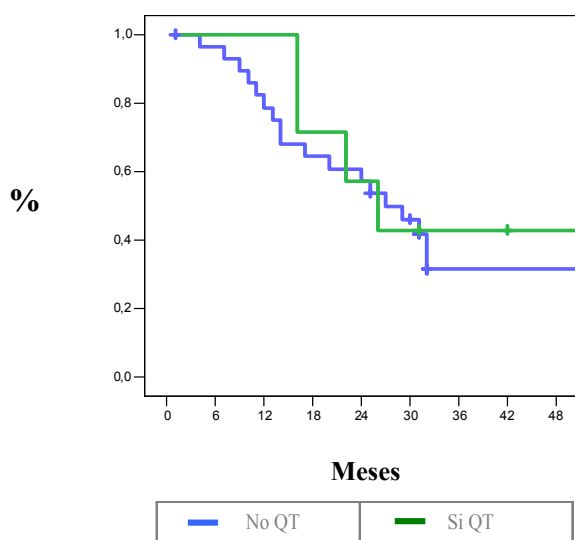


Figura 30. Supervivencia según el estadio tumoral en pacientes tratados con quimioterapia adyuvante.



Estadio tumoral II.



Estadio tumoral IIIA.

Figura 31. Supervivencia por estadios en pacientes con radioterapia adyuvante.

Marcadores séricos y titulares (ver tabla XIII):

La supervivencia a los 48 meses en los pacientes con cifras de CEA <5 ng/ml fue del 64% y en los ≥ 5 ng/ml del 56%. No existe diferencia estadística ($p=0,5$) (ver figura 32).

En relación al CA 12.5, la supervivencia a los 48 meses de los <15 U/ml fue del 67% y en los ≥ 15 U/ml del 28%. Presenta una implicación pronóstica en la supervivencia global el resultado preoperatorio del CA 12.5, con una asociación estadísticamente significativa ($p=0,004$) (figura 33).

La relación con la sobreexpresión de la proteína p53 la supervivencia global en los que no la sobreexpresaban fue del 68% y en los que sí del 57%; aunque no existe asociación estadística ($p=0,1$) (figura 34).

En cuanto a la sobreexpresión de la proteína p185, la supervivencia fue del 61% en los que no la sobreexpresaban y del 63% en los que sí. No existen diferencias significativas ($p=0,7$) (figura 35).

Tabla XIII. Porcentaje de supervivencia en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses para los distintos marcadores tumorales.						
MARCADORES	12meses n pr (EE)	24meses n pr (EE)	36meses n pr (EE)	48meses n pr (EE)	P	HR IC95%
CEA < 5 ng/ml	99 87% (3,2)	74 73% (4,3)	34 64% (4,8)	22 64% (4,8)	0,575	1
CEA ≥ 5 ng/ml	42 93% (3,7)	34 80% (6,0)	17 60% (7,7)	13 56% (8,1)		1,17 (0,69-1,98)
CA 12.5 < 15 U/ml	116 88% (2,8)	88 76% (3,8)	41 67% (4,4)	28 67% (4,4)	0,004	1
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	18 86% (7,4)	13 53% (10,9)	5 28% (9,9)	3 28% (9,9)		2,57 (1,42-4,64)
No sobreexpresión p53	52 91% (3,8)	42 80% (5,3)	23 72% (6,3)	18 68% (6,8)	0,151	1
Sobreexpresión p53	78 92% (2,9)	58 72% (4,9)	26 60% (5,6)	14 57% (5,9)		1,52 (0,85-2,71)
No sobreexpresión p185	91 89% (3,1)	71 76%(4,3)	33 65% (5,0)	25 61% (5,5)	0,713	1
Sobreexpresión p185	34 97% (2,7)	26 77% (7,2)	13 63% (8,5)	5 63% (8,5)		0,89 (0,46-1,70)

Pr: % libre de recidiva

EE: Error estándar

HR: Razon de tasas.

- HR>1: favorece el evento “aparición de cáncer de pulmón”.
- HR<1: previene el evento “aparición de cáncer de pulmón”. Factor protector

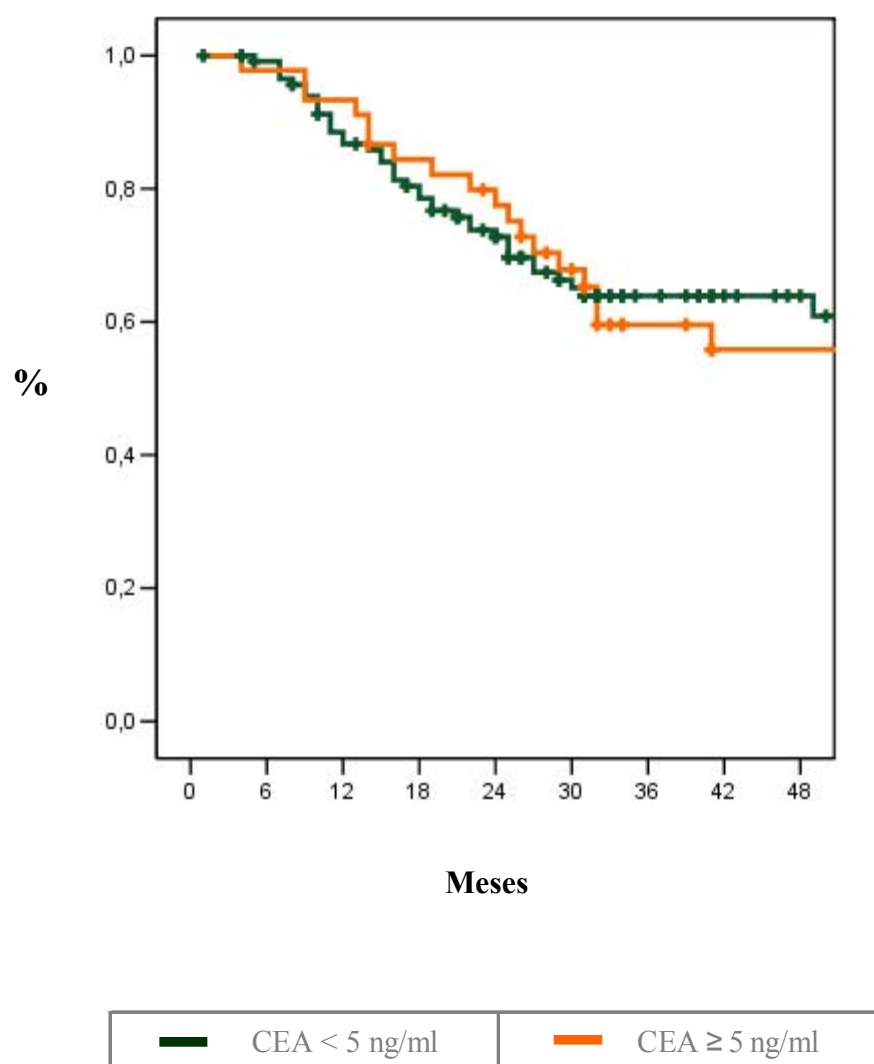


Figura 32. Supervivencia según los niveles de CEA.

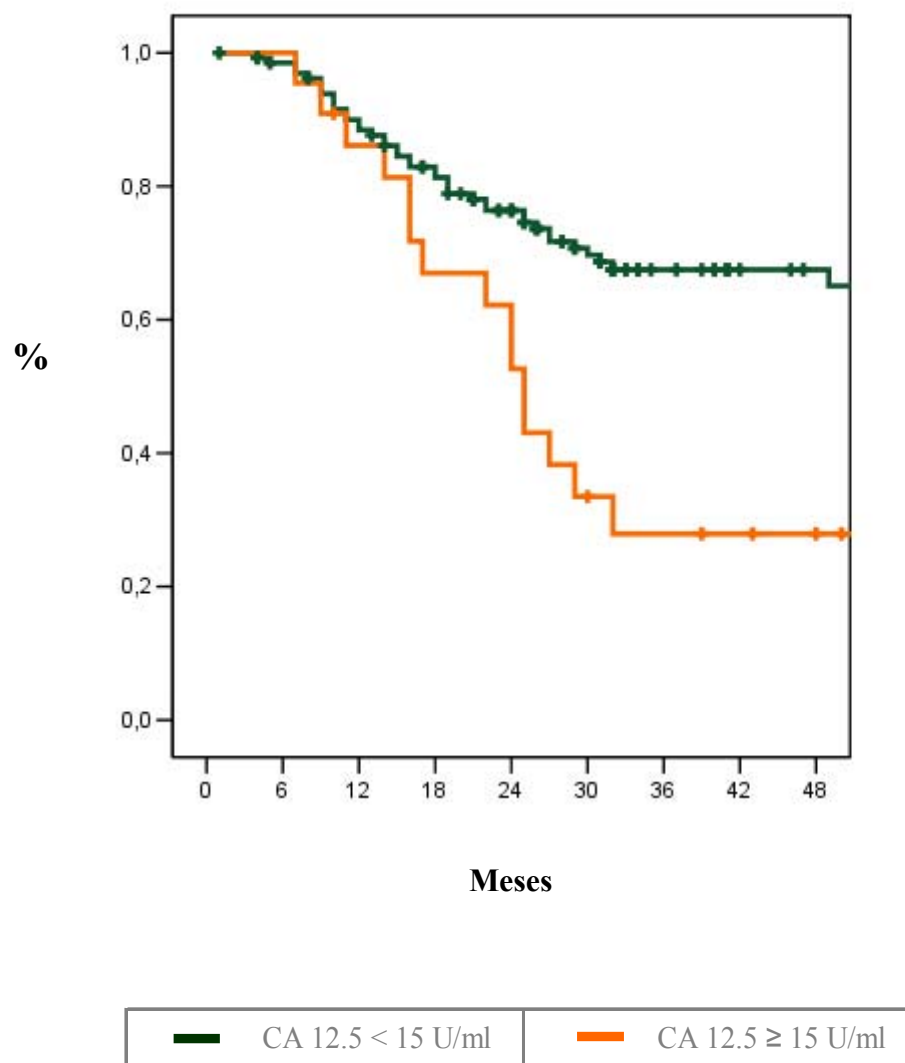


Figura 33. Supervivencia según los niveles de CA 12.5.

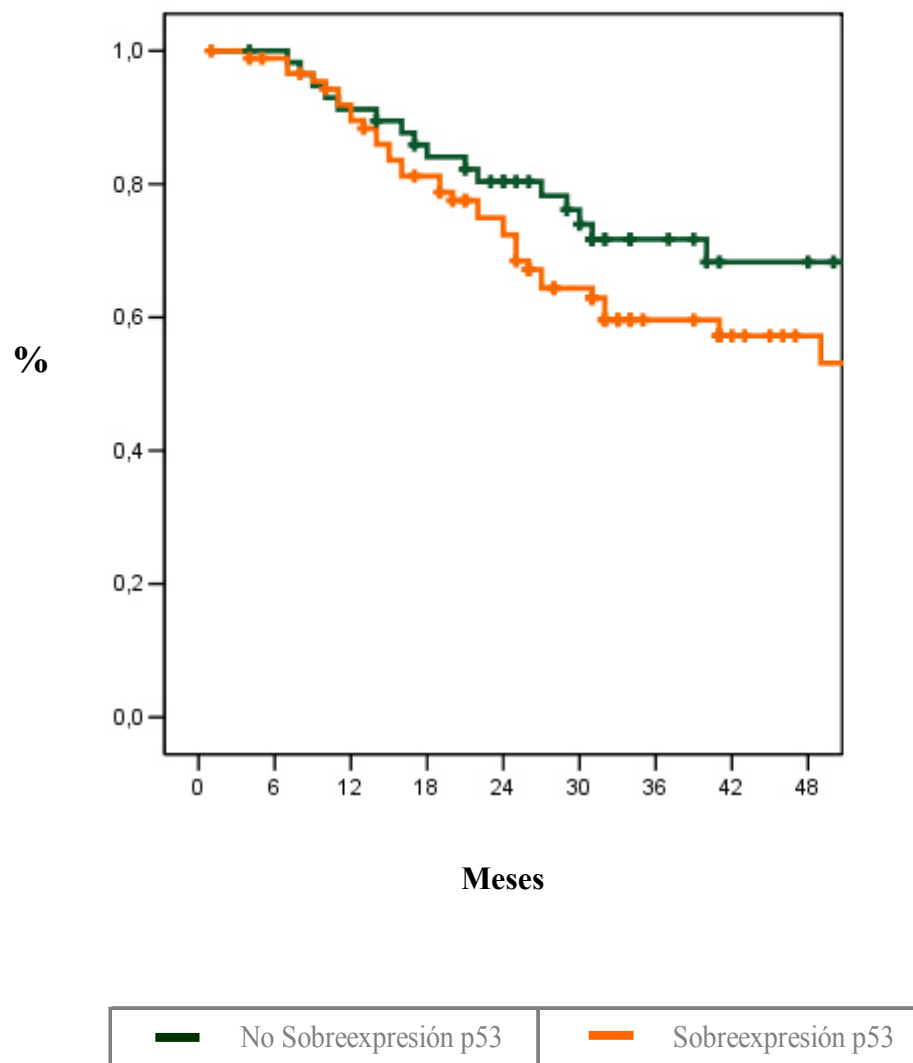


Figura 34. Supervivencia según la sobreexpresión de p53.

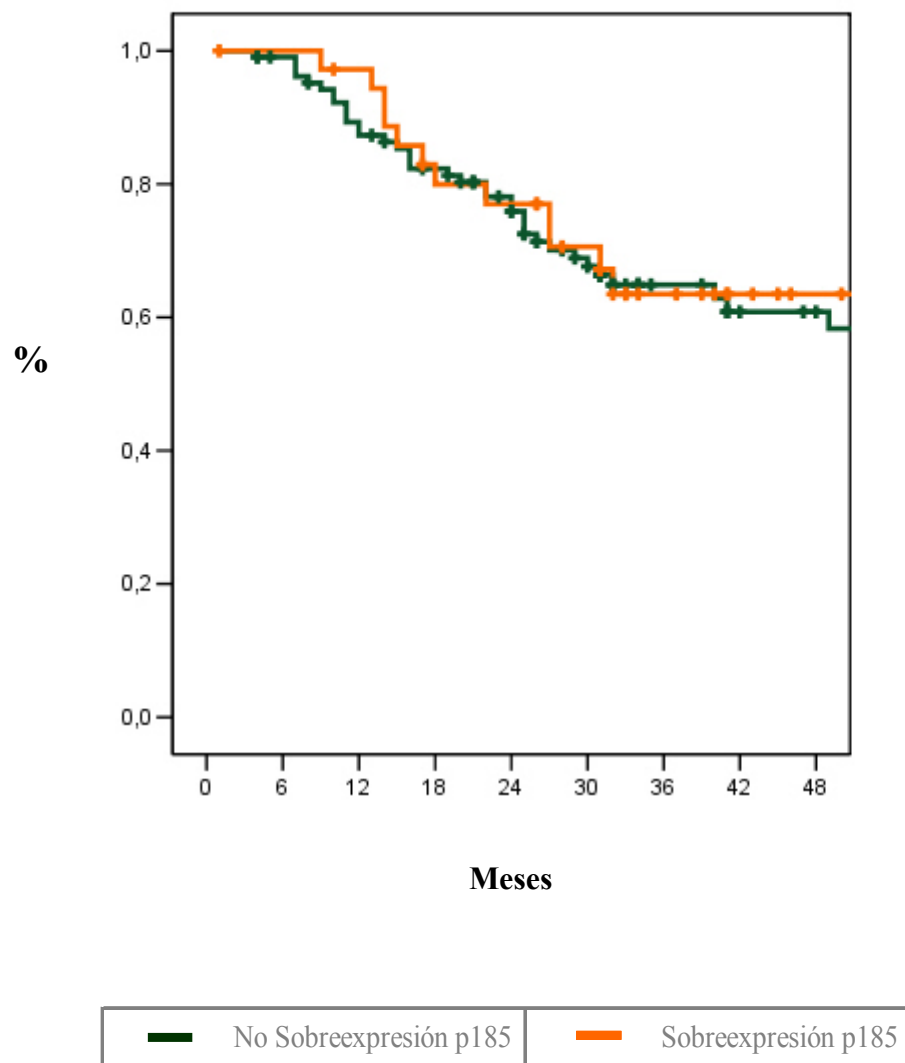


Figura 35. Supervivencia según la sobreexpresión de p185.

B.-) INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD EN RELACION CON LAS DIFERENTES VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS Y MARCADORES:

Variables clínico-patológicas (ver tabla XIV):

El intervalo libre de enfermedad fue del 76% a los 48 meses en aquellos tumores menores de 2 cm. y del 54% en los mayores ó iguales a este tamaño. No siendo estadísticamente significativa esta diferencia ($p=0,1$).

Según el tipo histológico, los tumores tipo epidermoide presentaron un intervalo libre de enfermedad del 62% a los 48 meses, los adenocarcinomas del 37%, los de células grandes del 70%, los ad. bronquioalveolares del 100% y los adenoescamosos del 0%. Siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p=0,004$) (figura 36).

En cuanto al grado de diferenciación, los tumores bien diferenciados presentaron un intervalo libre de enfermedad a los 48 meses del 58%, los moderadamente diferenciados del 52%, los pobremente diferenciados del 44% y los indiferenciados del 70%. No existen diferencias significativas ($p=0,3$).

Según el estadio tumoral, el intervalo libre de enfermedad fue a los 48 meses del 68% en los estadio I, del 51% en los estadio II, del 37% en los IIIA y del 27% en los estadio IIIB. Siendo estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,001$) (figura 37).

En relación al tratamiento adyuvante con radioterapia (RT), el intervalo libre de enfermedad a los 48 meses resultó del 63% en los no tratados con RT y del 39% en los que lo habían sido ($p=0,01$) con asociación estadísticamente significativa (figura 38). Analizando los datos por estadio tumoral se observa que en el estadio II el intervalo

libre de enfermedad es menor en los tratados con RT, sin embargo se invierte la tendencia en el estadio IIIA (figura 39).

Respecto al tratamiento adyuvante con quimioterapia (QT), el intervalo libre de enfermedad a los 48 meses es del 54% en los no tratados con QT y del 70% en los sí tratados ($p= 0,2$) (figura 40). Al analizar los resultados por estadios tumorales se observa que la mejoría en el intervalo libre de enfermedad tras tratamiento con QT es más importante en los estadios II y IIIA (figura 41).

Tabla XIV. Porcentaje de intervalo libre de enfermedad en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses para las distintas variables clínico-patológicas.						
MARCADORES	12meses n pr (EE)	24meses n pr (EE)	36meses n pr (EE)	48meses n pr (EE)	P	HR IC95%
GLOBAL	130 79% (3,2)	93 64% (3,8)	47 58% (4,0)	35 55% (4,3)		
Tamaño < 2cm.	8 89%(10,5)	7 89%(10,5)	1 76% (14,8)	1 76% (14,8)	0,192	1
Tamaño ≥ 2 cm.	122 78% (3,3)	86 62% (4,0)	46 57% (4,1)	34 54% (4,5)		2,27 (0,56-9,24)
Epidermoide	91 86% (3,4)	64 71% (4,5)	30 62% (5,0)	25 62% (5,0)	0,004	1
Adenocarcinoma	26 64% (7,5)	19 47% (7,8)	12 47% (7,8)	8 37% (8,8)		1,9 (1,16-3,14)
Carcinoma de Células Grandes	7 70% (14,5)	6 70% (14,5)	1 70% (14,5)	0 70% (14,5)		0,96 (0,30-3,09)
Adenoca. Bronquioalveolar	4 100% (-)	4 100% (-)	4 100% (-)	2 100% (-)		Indeterminado
Adenoescamoso	1 33% (27,2)	0 0% (0,0)	0 0% (0,0)	0 0% (0,0)		5,52 (1,67-18,26)
Bien diferenciado	52 84% (4,7)	43 74% (5,6)	14 70% (5,9)	9 58% (9,5)	0,321	1
Moderadamente diferenciado	50 79,6% (5,1)	31 63% (6,2)	22 52% (6,7)	17 52% (6,7)		1,40 (0,81-2,43)
Poco diferenciado	21 69% (8,6)	13 44% (9,4)	10 44% (9,4)	9 44% (9,4)		1,79 (0,94-3,39)
Indiferenciado	7 70% (14,5)	6 70% (14,5)	1 70% (14,5)	0 70% (14,5)		1,01 (0,30-3,36)

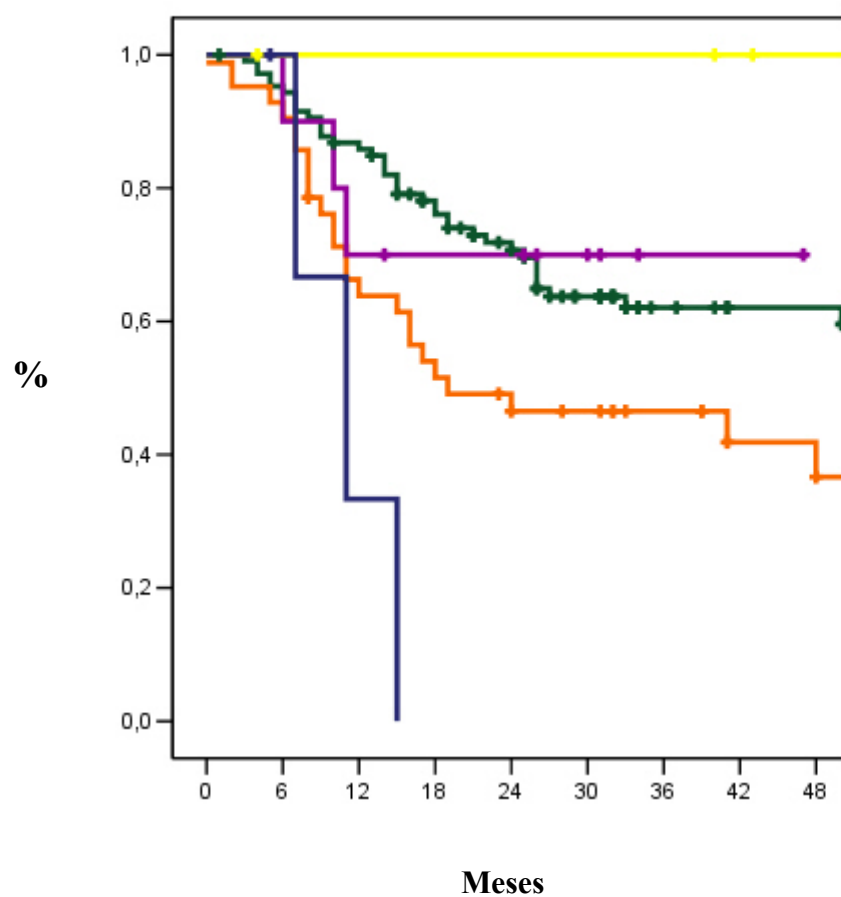
Estadio I	68 84% (4,1)	50 75% (4,9)	27 71% (5,3)	21 68% (6,0)	0,001	1
Estadio II	36 82% (5,8)	26 65% (7,4)	14 56% (7,9)	8 51% (8,7)		1,6 (0,90-2,91)
Estadio IIIA	25 69% (7,8)	16 43% (8,4)	5 37% (8,2)	5 37% (8,2)		2,7 (1,53-4,76)
Estadio IIIB	1 27% (22,6)	1 27% (22,6)	1 27% (22,6)	1 27% (22,6)		6,6 (2,28-19,09)
No Radioterapia postoperatoria	90 82% (3,6)	67 70% (4,4)	38 65% (4,7)	30 63% (5,1)	0,014	0,55 (0,34-0,88)
Radioterapia postoperatoria	40 72% (6,2)	26 52% (7,0)	9 45% (7,1)	5 39% (8,5)		1
No Quimioterapia postoperatoria	116 77% (3,4)	83 63% (4,0)	41 57% (4,2)	30 54% (4,6)	0,285	1,59 (0,64-3,97)
Quimioterapia postoperatoria	14 93% (6,9)	10 77% (11,5)	6 70% (12,7)	5 70% (12,7)		1

Pr: % libre de recidiva

EE: Error estándar

HR: Razon de tasas.

- HR>1: favorece el evento “aparición de cáncer de pulmón”.
- HR<1: previene el evento “aparición de cáncer de pulmón”. Factor protector.



— Epidermoide	— Ca. células grandes
— Adenocarcinoma	— Ad. Bronquioalveolar
— Adenoescamoso	

Figura 36. Intervalo libre de enfermedad según el tipo histológico.

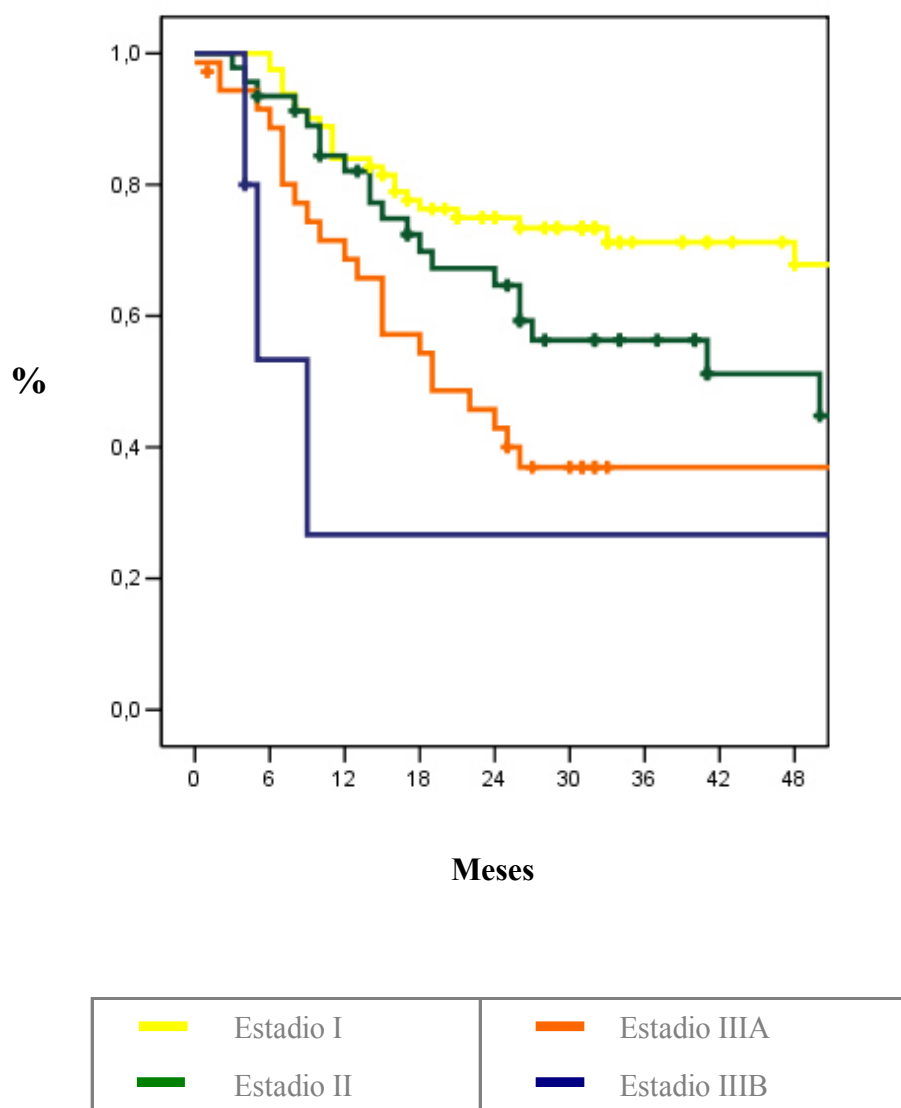


Figura 37. Intervalo libre de enfermedad según el estadio tumoral.

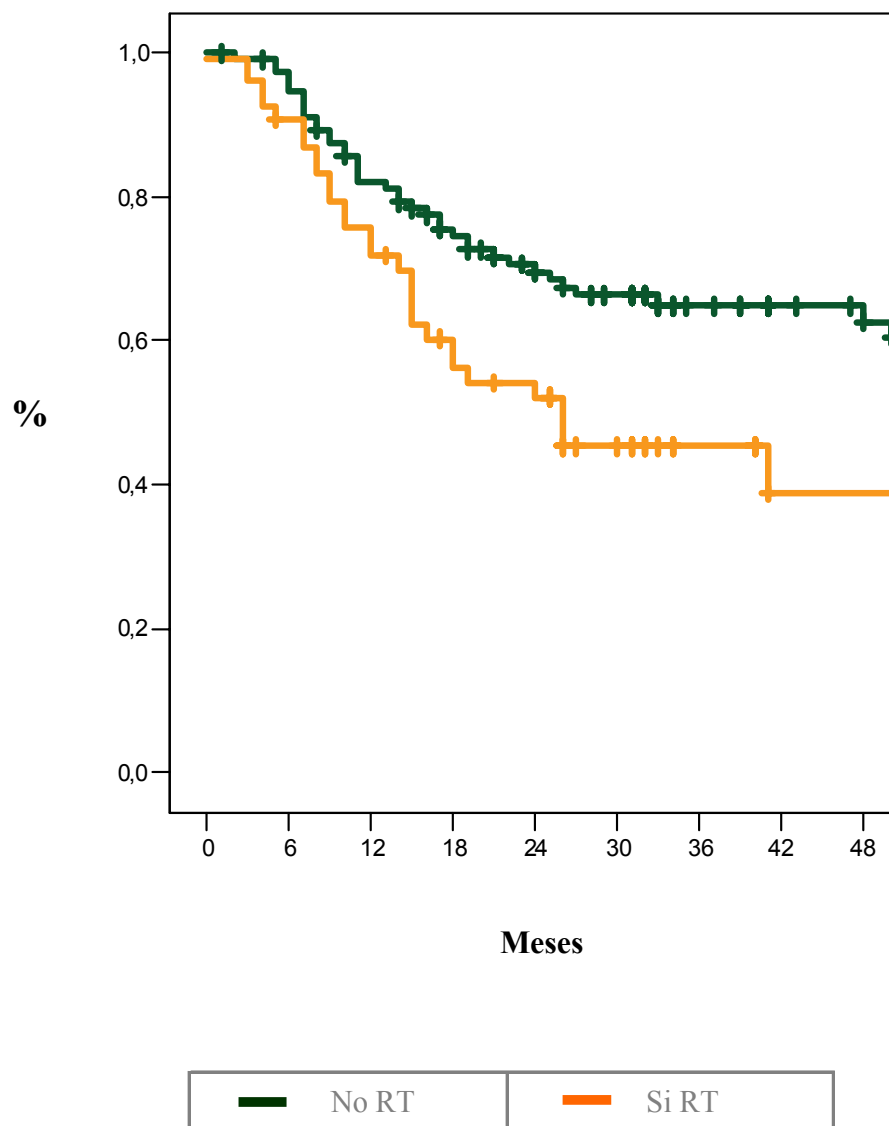
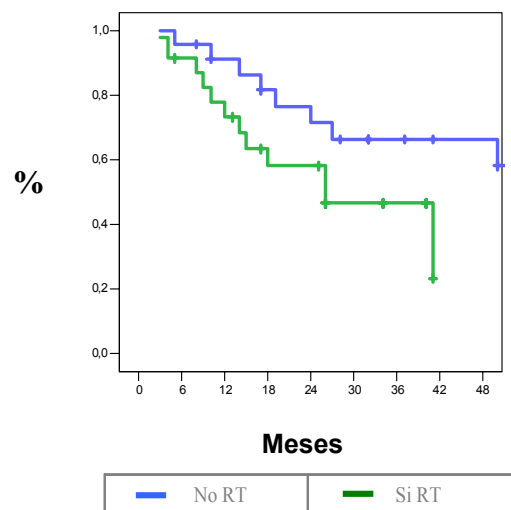
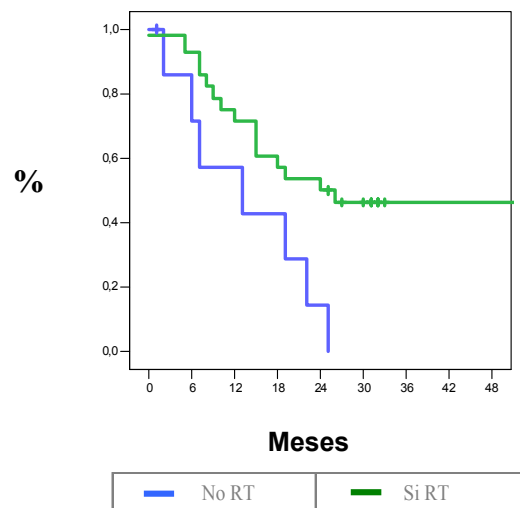


Figura 38. Intervalo libre de enfermedad global en pacientes tratados con radioterapia adyuvante.



Estadio tumoral II.



Estadio tumoral IIIA.

Figura 39 Intervalo libre de enfermedad por estadios en pacientes con radioterapia adyuvante.

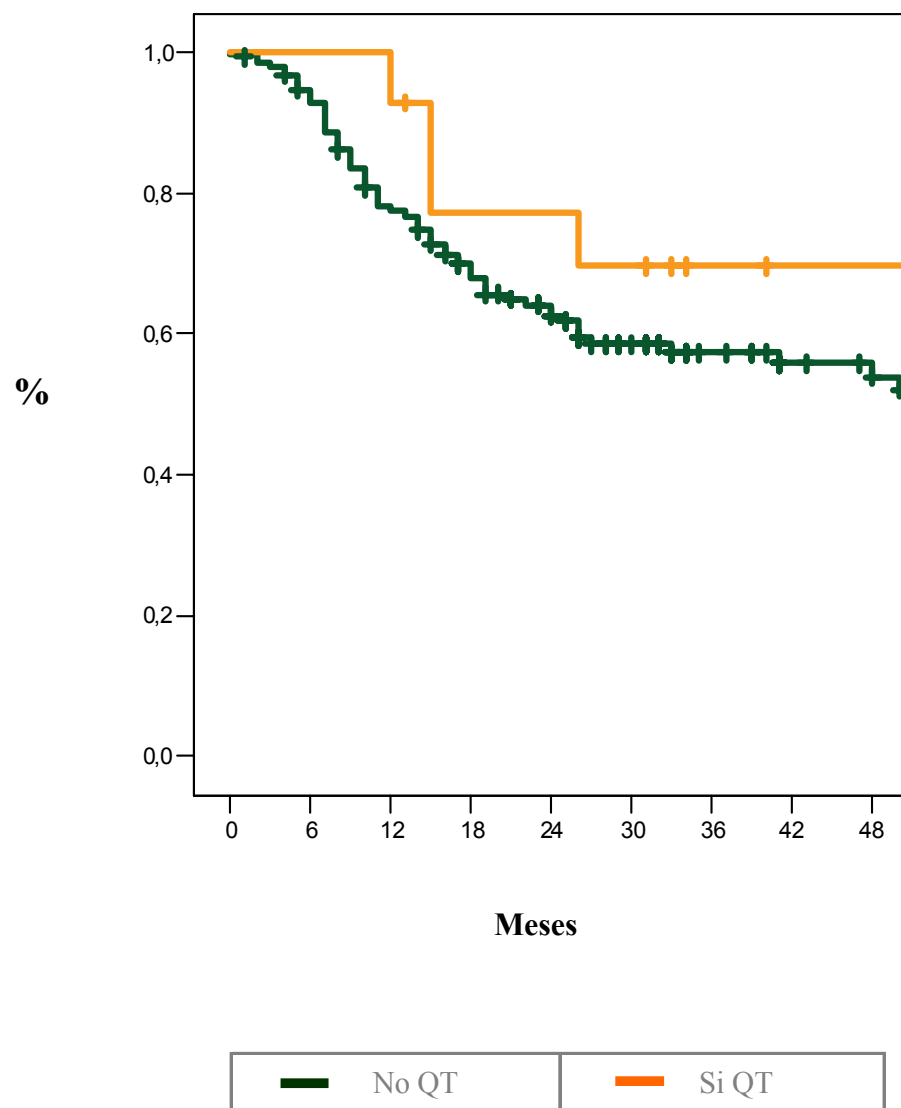
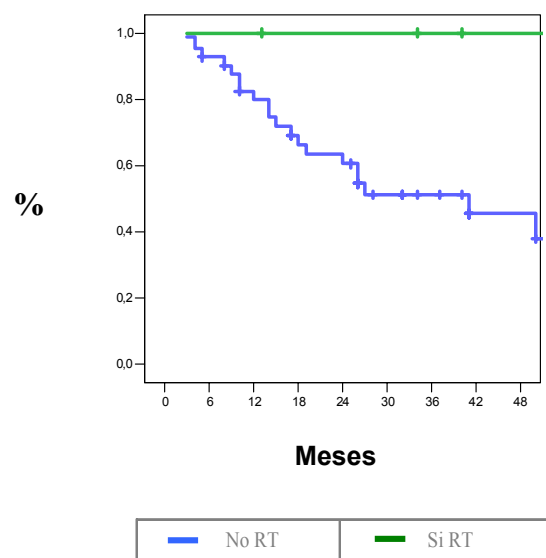
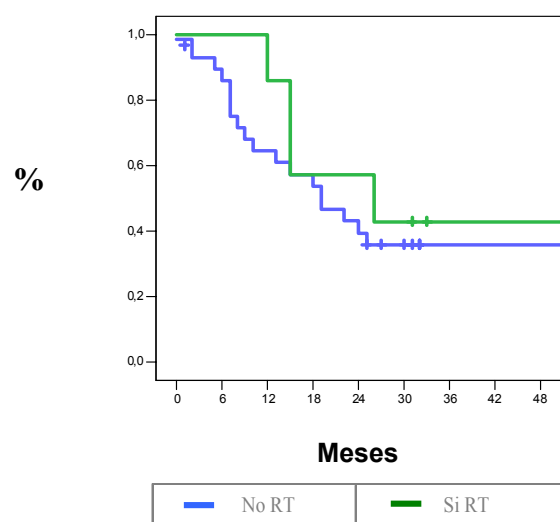


Figura 40. Intervalo libre de enfermedad global en pacientes tratados con quimioterapia adyuvante.



Estadio tumoral II.



Estadio tumoral IIIA.

Figura 41. Intervalo libre de enfermedad por estadios en pacientes con radioterapia adyuvante.

Marcadores séricos y titulares (ver tabla XV):

El intervalo libre de enfermedad a los 48 meses, fue del 57% en aquellos que presentaban cifras de CEA <5 ng/ml, y del 52% en ≥ 5 ng/ml. Sin diferencias significativas ($p=0,1$) (figura 42).

En relación al CA 12.5, el intervalo libre de enfermedad a los 48 meses de los <15 U/ml fue del 61% y en los ≥ 15 U/ml del 29%. Presenta una implicación pronóstica con una asociación estadísticamente significativa ($p=0,01$) (figura 43).

Los tumores que no sobreexpresaron la proteína p53 tuvieron un intervalo libre de enfermedad a los 48 meses del 69%, y los que sí lo sobreexpresaron del 46%. Estas diferencias son estadísticamente significativas ($p=0,02$) (figura 44).

El intervalo libre de enfermedad a los 48 meses en los tumores que no sobreexpresaban la proteína p185 fue del 57%, y en los que sí del 51%. No existen diferencias significativas ($p=0,2$) (figura 45).

Tabla XV. Porcentaje de intervalo libre de enfermedad en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses para los distintos marcadores tumorales.						
MARCADORES	12meses n pr (EE)	24meses n pr (EE)	36meses n pr (EE)	48meses n pr (EE)	P	HR IC95%
CEA < 5 ng/ml	92 81% (3,7)	64 66% (4,5)	30 62% (4,7)	20 57% (5,7)	0,166	1
CEA ≥ 5 ng/ml	34 73% (6,6)	26 60% (7,4)	15 52% (7,7)	13 52% (7,7)		1,43 (0,87-2,33)
CA 12.5 < 15 U/ml	103 79% (3,6)	77 68% (4,1)	36 65% (4,3)	26 61% (5,0)	0,017	1
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	17 77% (9,0)	8 39% (10,6)	5 29% (9,9)	3 29% (9,9)		2,13 (1,19-3,82)
No sobreexpresión p53	49 86% (4,6)	38 71% (6,1)	21 69% (6,3)	17 69% (6,3)	0,025	1
Sobreexpresión p53	65 75% (4,6)	44 60% (5,3)	20 52% (5,7)	13 46% (6,7)		1,84 (1,06-3,19)

No sobreexpresión p185	86 83% (3,7)	62 68%(4,7)	29 62% (5,1)	24 57% (5,7)	0,294	1
Sobreexpresión p185	25 72% (7,5)	17 54% (8,5)	9 51% (8,6)	4 51% (8,6)		1,36 (0,77-2,40)

Pr: % libre de recidiva

EE: Error estándar

HR: Razon de tasas.

- HR>1: favorece el evento “aparición de cáncer de pulmón”.
- HR<1: previene el evento “aparición de cáncer de pulmón”. Factor protector.

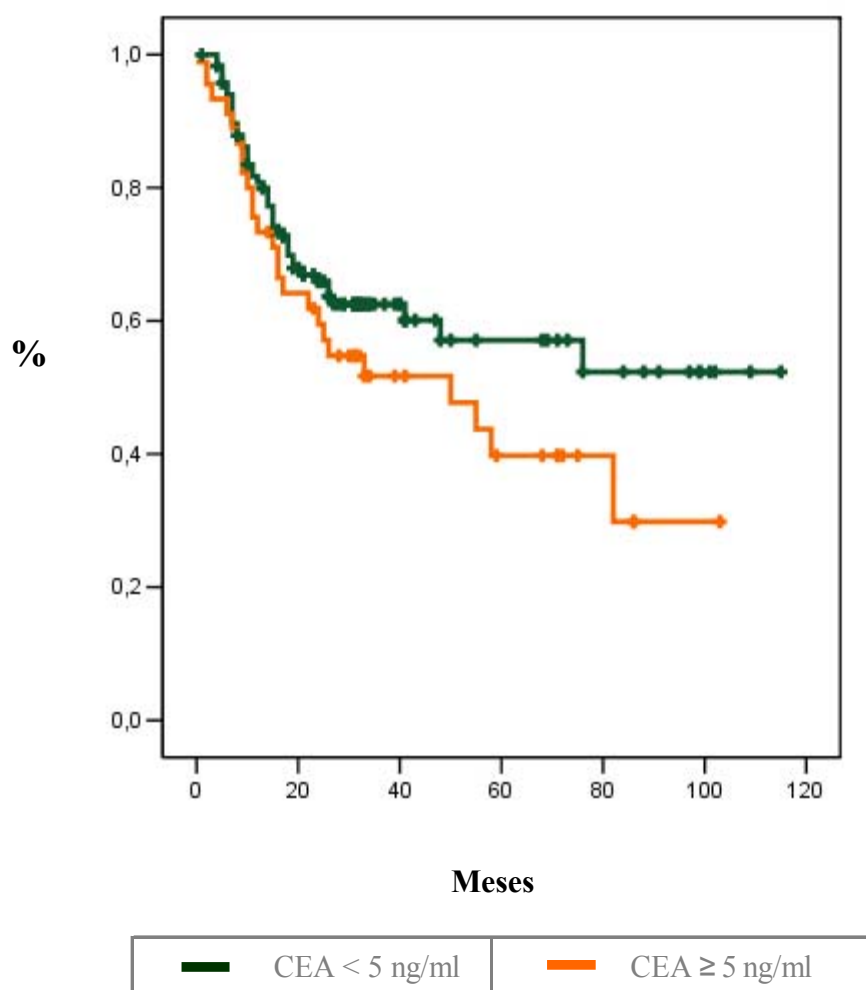


Figura 42. Intervalo libre de enfermedad según los niveles séricos de CEA.

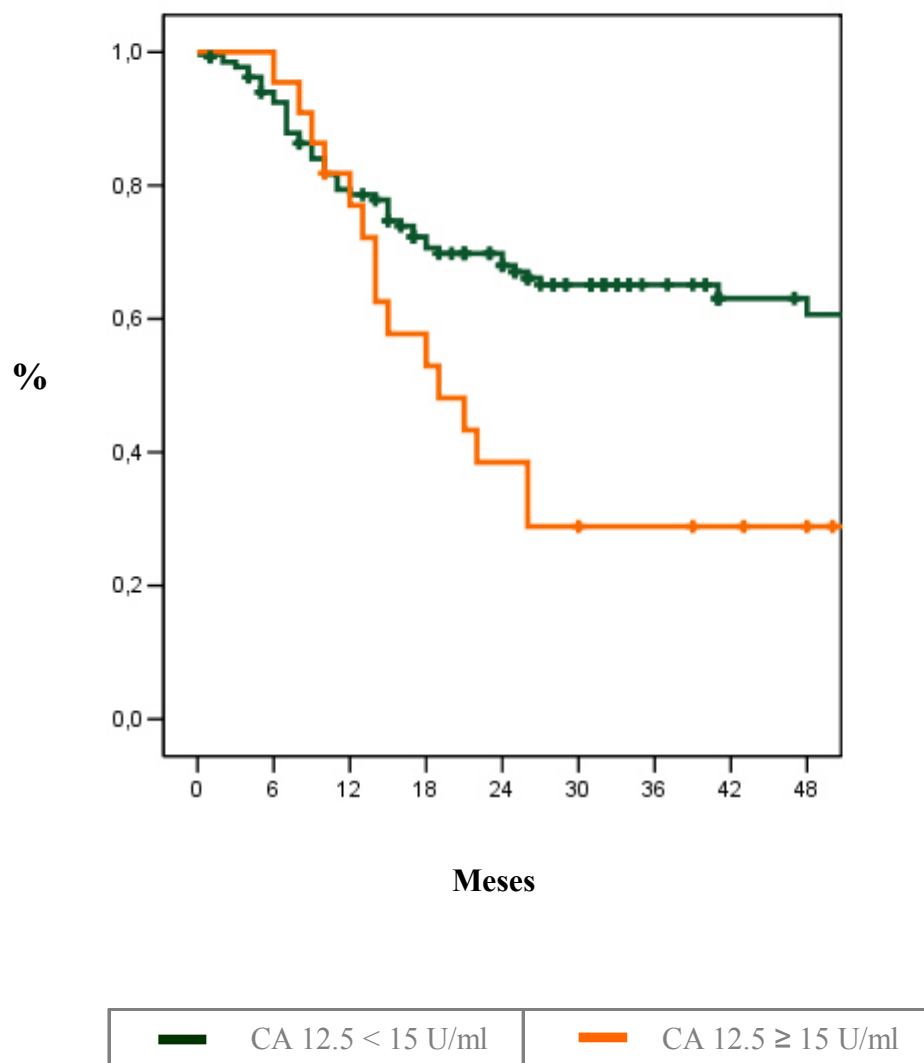


Figura 43. Intervalo libre de enfermedad según los niveles séricos de CA 12.5.

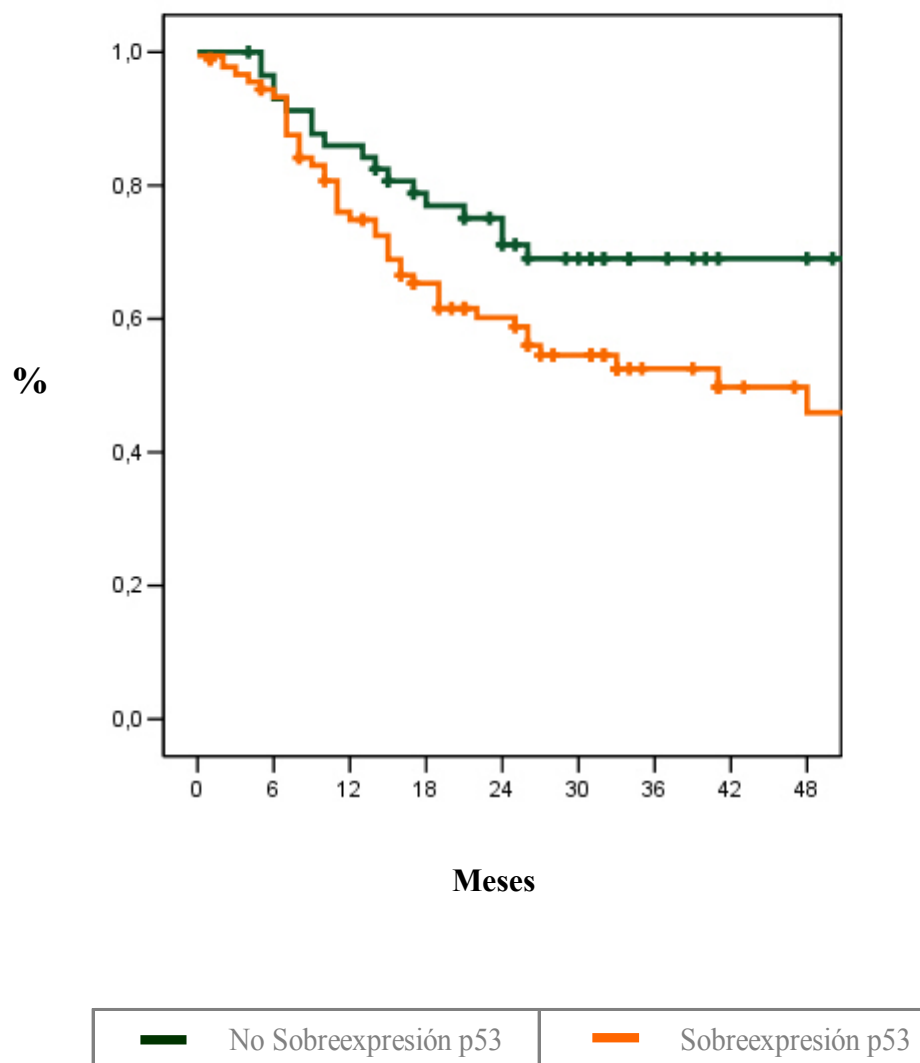


Figura 44. Intervalo libre de enfermedad según la sobreexpresión de p53.

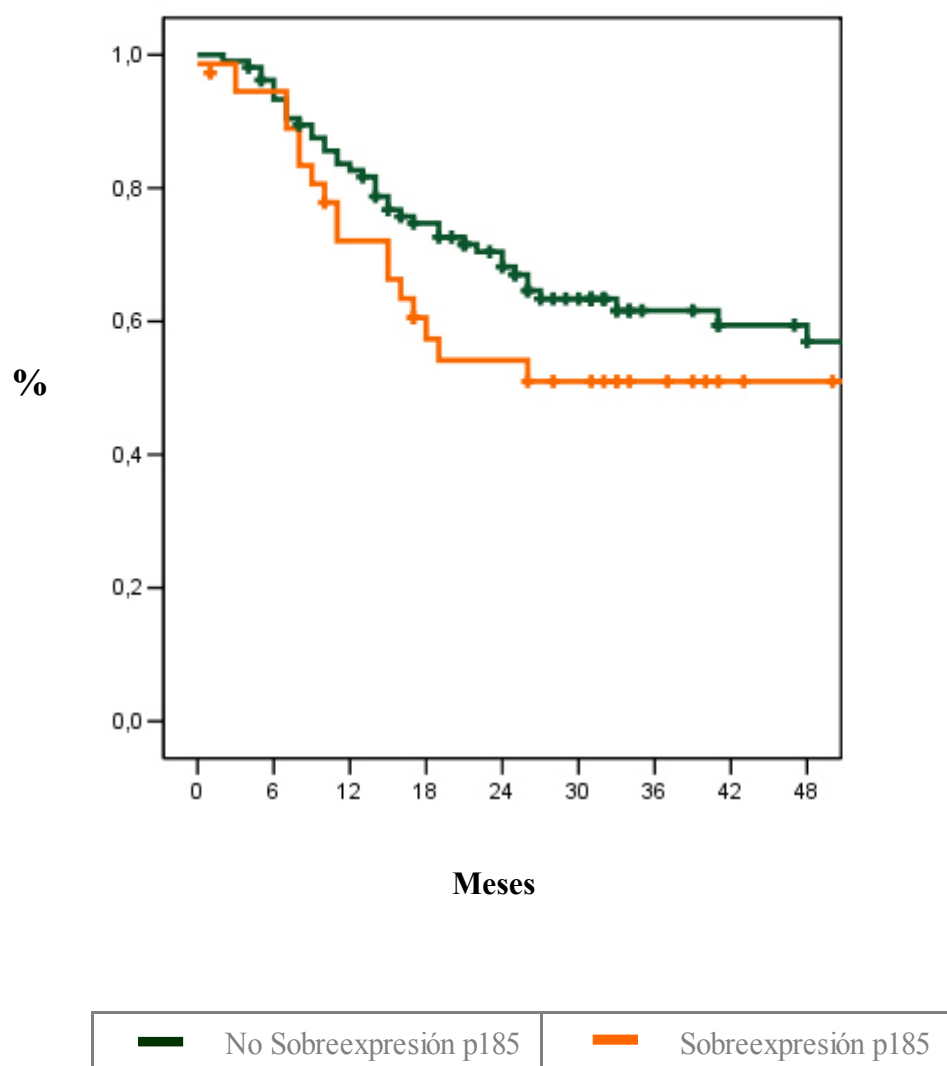


Figura 45. Intervalo libre de enfermedad según la sobreexpresión de p185.

C.-) ANALISIS ESTRATIFICADO DE LA SUPERVIVENCIA:

A continuación se analizaron los resultados de supervivencia e intervalo libre de enfermedad a los 12, 24, 36 y 48 meses, relacionando cada uno de los marcadores, tanto séricos como tisulares, con las diferentes variables clínico-patológicas; así como los marcadores entre sí.

Supervivencia en relación con el CEA:

En relación con las variables clínico-patológicas, no se encuentran asociaciones estadísticamente significativas en relación con las cifras del CEA.

El estudio de la relación del CEA con los otros marcadores tampoco obtuvo asociaciones significativas.

Supervivencia en relación con el CA 12.5 (ver tabla XVI):

En cuanto al tamaño del tumor, en aquellos que son mayores ó iguales a 2cm., la supervivencia a los 48 meses fue del 67% en los CA 12.5 <15 U/ml y del 28% en los ≥ 15 U/ml. Esta diferencia es estadísticamente significativa ($p= 0,01$).

La supervivencia de los tumores epidermoides con CA 12.5 <15 U/ml fue del 69% y en los mayores ó iguales de 15 U/ml del 15%; estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa ($p< 0,001$). En relación con los adenocarcinomas la supervivencia fue menor en aquellos cuyas cifras de CA 12.5 eran ≥ 15 U/ml pero sin significación estadística; de forma semejante aconteció con el resto de los tipos histológicos.

En relación con el grado de diferenciación, los tumores bien diferenciados presentaron una supervivencia mayor en los <15 U/ml, un 78% frente a un 25%, con asociación estadísticamente significativa ($p= 0,03$). No se observa en los demás grados de diferenciación.

En cuanto al estadio tumoral y las cifras de CA 12.5 sólo se estableció asociación estadísticamente significativa en el estadio IIIA, donde la supervivencia fue del 43% en los que los valores no alcanzaban los 15 U/ml y del 0% en los que la superaban ($p= 0,03$). Así mismo, dentro del estadio IIIA, en los N2 se observó esa misma relación estadística ($p= 0,049$).

La supervivencia de los pacientes con cifras de CA 12.5 ≥ 15 U/ml fue menor, tanto en los que presentaban cifras de CEA menor como en los mayores a 5 ng/ml; existe asociación estadísticamente significativa en los CEA menores ($p= 0,03$) y una tendencia en los mayores de 5 ng/ml ($p= 0,06$).

En relación con los tumores que no sobreexpresaron p53, tuvieron una mayor supervivencia aquellos cuyas cifras de CA 12.5 fueron <15 U/ml ($p= 0,002$); no se aprecia esta relación estadística en los que sí sobreexpresaron p53.

La supervivencia fue menor en los pacientes con cifras de CA 12.5 ≥ 15 U/ml tanto en los que no sobreexpresaron p185 ($p= 0,001$), como en los que sí ($p= 0,9$). Existe asociación estadística en los primeros.

Tabla XVI. Porcentaje de supervivencia en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses. Análisis estratificado para el CA 12.5.					
MARCADORES	12meses n pr (EE)	24meses n pr (EE)	36meses n pr (EE)	48meses n pr (EE)	P
TAMAÑO ≥ 2 cm					
CA 12.5 < 15 U/ml	109 88% (3,0)	82 75% (4,0)	41 67% (4,5)	28 67% (4,5)	0,011
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	18 86% (7,4)	13 53% (10,9)	5 28% (10,0)	3 28% (10,0)	
EPIDERMOIDE					
CA 12.5 < 15 U/ml	76 92% (3,1)	58 80% (4,5)	25 69% (5,5)	19 69% (5,5)	< 0,001
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	12 92% (7,4)	8 46% (13,8)	2 15% (10,0)	2 15% (10,0)	
BIEN DIFERENCIADO					
CA 12.5 < 15 U/ml	52 90% (4,1)	44 82% (5,1)	13 78% (5,6)	8 78% (5,6)	0,031
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	3 75% (21,7)	3 50% (25,0)	1 25% (21,7)	1 25% (21,7)	
ESTADIO IIIA					
CA 12.5 < 15 U/ml	23 88% (6,5)	17 68% (9,3)	6 43% (10,5)	5 43% (10,5)	0,033
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	6 67% (15,7)	4 33% (15,7)	0 0% (-)	0 0% (-)	
CEA < 5 mg/ml					
CA 12.5 < 15 U/ml	83 86% (3,6)	62 75% (4,5)	27 70% (5,0)	17 70% (5,0)	0,033
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	14 88% (8,1)	10 56% (12,4)	5 31% (11,6)	3 31% (11,6)	
NO SOBREEXPRESION P53					
CA 12.5 < 15 U/ml	39 93% (4,0)	33 88% (5,1)	15 75% (7,2)	11 75% (7,2)	0,002
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	8 80% (12,7)	4 40% (15,5)	3 40% (15,5)	3 40% (15,5)	

NO SOBREEXPRESION P185					
CA 12.5 < 15 U/ml	73 90% (3,3)	57 81% (4,4)	25 70% (5,5)	19 70% (5,5)	0,001
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	9 75% (12,5)	6 50% (14,4)	2 25% (12,5)	2 25% (12,5)	

Pr: % libre de recidiva

EE: Error estándar

Supervivencia en relación con la sobreexpresión de p53:

No se encontró asociación estadísticamente significativa entre las cifras de p53 y el resto de variables y marcadores.

Supervivencia en relación con la sobreexpresión de p185:

No se observa asociación estadísticamente significativa entre las cifras de p185 y el resto de variables y marcadores.

D.-) ANALISIS ESTRATIFICADO DEL INTERVALO LIBRE DE ENFERMEDAD:

Del mismo modo que con la supervivencia se analizó el intervalo libre de enfermedad a los 12, 24, 36 y 48 meses.

Intervalo libre de enfermedad en relación con el CEA:

No existen asociaciones estadísticamente significativas entre el CEA y el resto de variables del estudio.

Intervalo libre de enfermedad en relación con el CA 12.5 (ver tabla XVII):

Los tumores con tamaño ≥ 2 cm. y los bien diferenciados presentaron mayores intervalos libres de enfermedad en aquellos pacientes cuyas cifras del CA 12.5 eran <15 U/ml, del 60% y con $p=0,06$ en ambos casos.

En relación con el tipo histológico, los epidermoides que se asociaban con cifras de CA 12.5 <15 U/ml, presentaban un intervalo libre de enfermedad del 71% frente al 15% de los ≥ 15 U/ml; esta asociación es estadísticamente significativa ($p=0,006$).

Se observó asociación estadística entre aquellos tumores que no sobreexpresaban p53 y el CA 12.5: presentando un intervalo libre de enfermedad del 75% los tumores con cifras <15 U/ml, frente al 40% en los ≥ 15 U/ml ($p=0,03$).

Similar situación se presentó entre los tumores que no sobreexpresaron p185 cuando se relacionaron con las cifras de CA 12.5: se observó un mayor intervalo libre de enfermedad entre los pacientes con CA 12.5 <15 U/ml (63%) frente al 25% en los ≥ 15 U/ml, con significación estadística ($p=0,004$).

Tabla XVII. Porcentaje de intervalo libre de enfermedad en cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses. Análisis estratificado para el CA 12.5.					
MARCADORES	12meses n pr (EE)	24meses n pr (EE)	36meses n pr (EE)	48meses n pr (EE)	P
EPIDERMOIDE					
CA 12.5 < 15 U/ml	71 83% (4,1)	53 76% (4,8)	23 71% (5,2)	18 71% (5,2)	0,006
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	12 93% (6,9)	4 31% (12,8)	2 15% (10,1)	2 15% (10,1)	
NO SOBREEXPRESION P53					
CA 12.5 < 15 U/ml	36 86% (5,4)	29 81% (6,2)	14 75% (6,9)	10 75% (6,9)	0,033
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	8 80% (12,7)	4 40% (15,5)	3 40% (15,5)	3 40% (15,5)	
NO SOBREEXPRESION P185					
CA 12.5 < 15 U/ml	68 83% (4,1)	52 75% (8,9)	23 70% (5,3)	17 63% (6,7)	0,004
CA 12.5 ≥ 15 U/ml	9 75% (12,5)	3 25% (12,5)	2 25% (12,5)	1 25% (12,5)	

Pr: % libre de recidiva

EE: Error estándar

Intervalo libre de enfermedad en relación con la sobreexpresión de p53 (ver tabla XVIII):

No se estableció ninguna asociación estadística entre p53 y el resto de variables; aunque sí se observó que aquellos pacientes con carcinoma de células grandes, los indiferenciados y los que tuvieron cifras de CEA ≥ 5 ng/ml presentaron intervalos libres de enfermedad menores cuando se sobreexpresó la proteína p53 ($p=0,05$).

Tabla XVIII. Porcentaje de intervalo libre de enfermedad en el cáncer de pulmón a los 12, 24, 36 y 48 meses. Análisis estratificado para la sobreexpresión de p53.					
MARCADORES	12meses n pr (EE)	24meses n pr (EE)	36meses n pr (EE)	48meses n pr (EE)	P
ADENOCA. DE CÉL. GRANDES					
NO SOBREEXPRESIO N P53	5 100%(-)	4 100%(-)	0 100%(-)	0 100%(-)	0,05
SOBREEXPRESIO N P53	2 40%(21,9)	2 40%(21,9)	1 40%(21,9)	0 40%(21,9)	
TUMORES INDIFERENCIADOS					
NO SOBREEXPRESIO N P53	5 100%(-)	4 100%(-)	1 100%(-)	0 100%(-)	0,05
SOBREEXPRESIO N P53	2 40%(21,9)	2 40%(21,9)	1 40%(21,9)	0 40%(21,9)	

CEA \geq 5 NG/ML					
NO SOBREEXPRESIO N P53	12 86%(9,4)	10 77%(11,7)	6 77%(11,7)	5 77%(11,7)	0,05
SOBREEXPRESIO N P53	18 69%(9,1)	13 50%(9,8)	6 37%(9,8)	5 37%(9,8)	

Pr: % libre de recidiva

EE: Error estándar

Intervalo libre de enfermedad en relación con la sobreexpresión de p185:

No se establecieron asociaciones estadísticamente significativas entre p185 y las demás variables del estudio.

IV.5.- ANALISIS MULTIVARIANTE (MODELO DE REGRESIÓN DE RIESGOS PROPORCIONALES DE COX):

Con el fin de determinar el impacto de cada variable sobre la supervivencia e intervalo libre de enfermedad, es decir, la razón de tasas y sus intervalos de confianza, las variables que obtuvieron significación estadística en la comparación de las curvas de supervivencia e intervalo libre de enfermedad de Kaplan-Meier fueron introducidas en un modelo de riesgos proporcionales de Cox.

A.- Los resultados obtenidos en el estudio de supervivencia se exponen en la tabla XIX:

Tabla XIX.. Modelo de riesgos proporcionales de Cox en relación con la supervivencia.

Variable	HR (IC 95%)	p
Epidermoide	0,68 (0,34-1,34)	0,263
Estadio tumoral		
I	1	
II	2,15 (0,95-4,88)	0,068
IIIA	4,16 (2,03-8,52)	< 0,001*
IIIB	2,98 (0,35-25,71)	0,32
CEA >5 ng/ml	No pronóstico	
CA 12.5 >15 U/ml	2,43 (1,22-4,86)	0,012*
Sobreexpresión p53	0,69 (0,36-1,32)	0,260
Sobreexpresión p185	0,63 (0,31-1,27)	0,194
RT/QT adyuvantes	No pronóstico	

* Las variables incluidas en el modelo fueron: tumor epidermoide, estadio tumoral TNM, CEA, CA 12.5, sobreexpresión de p53, sobreexpresión de p185, Radioterapia y Quimioterapia adyuvantes.

Las variables: tumor epidermoide, la sobreexpresión de p53 y la sobreexpresión de p185 actúan como factores protectores relevantes no significativos.

El CA 12.5 y el estadio tumoral (sobretudo el estadio IIIA) actúan como factores de riesgo relevantes y significativos.

Con el CEA no hemos encontrado efecto pronóstico.

El tratamiento adyuvante con radioterapia y/o quimioterapia no constituyó efecto pronóstico.

Además, al introducir una interacción entre p53 y p185, cuando p53 está sobreexpresada, la sobreexpresión de p185 se comporta como protector, HR: 0,16;IC (0,03-0,80), $p=0,01^*$ (figuras 46 y 47). Si se realiza un análisis de esta interacción por estadios tumorales, se encuentra este fuerte efecto protector en estadio I, HR: 0,27 ($p=0,06^*$); y sobretudo en estadio IIIA, HR: 0,02 ($p=0,027^*$); sin embargo, en estadio II, se invierte su significación clínica pasando a una razón de tasas (HR) de 1,82 con $p=0,04$; este resultado puede estar influenciado por el pequeño tamaño muestral.

Así, en resumen, podemos concluir que el CA 12.5 y el estadio IIIA son factores de mal pronóstico independientes en el carcinoma no microcítico de pulmón intervenido con intención curativa. Sin embargo hay un sinergismo con la proteína p53, de tal manera que cuando ésta está sobreexpresada, el efecto protector de p185 aumenta de forma clínica y estadísticamente relevante.

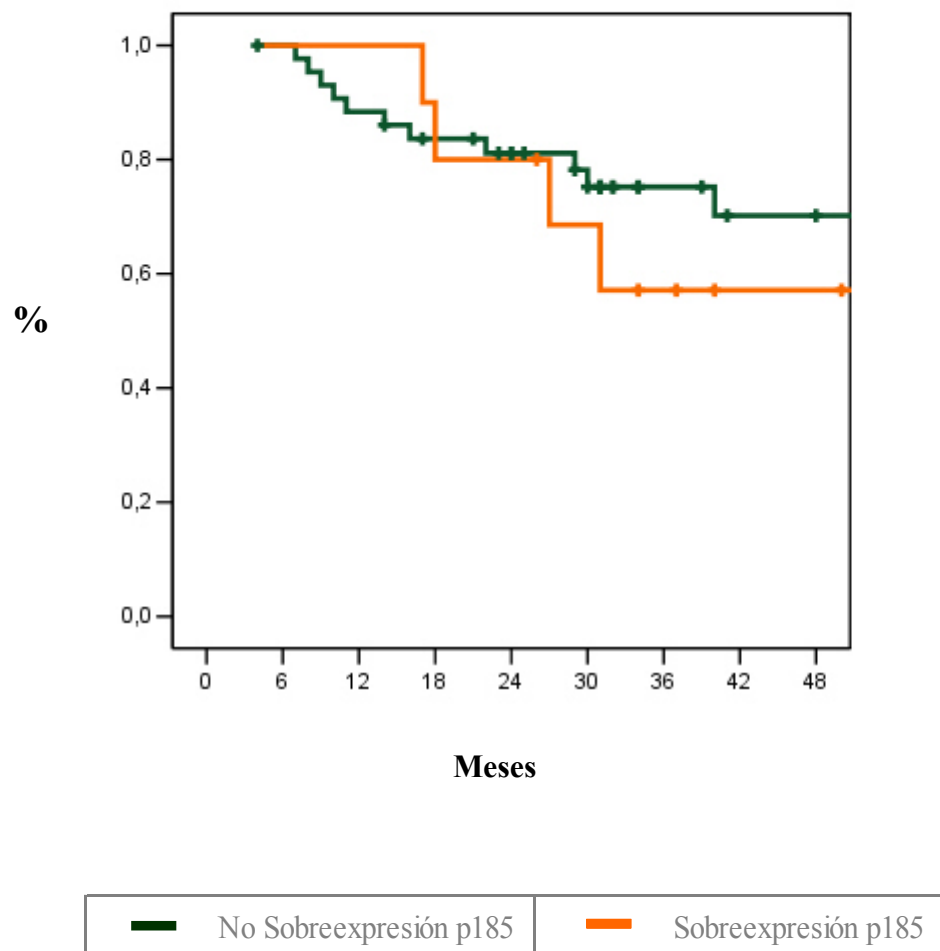


Figura 46. Supervivencia de los tumores que no sobreexpresan p53 en relación con los niveles de p185.

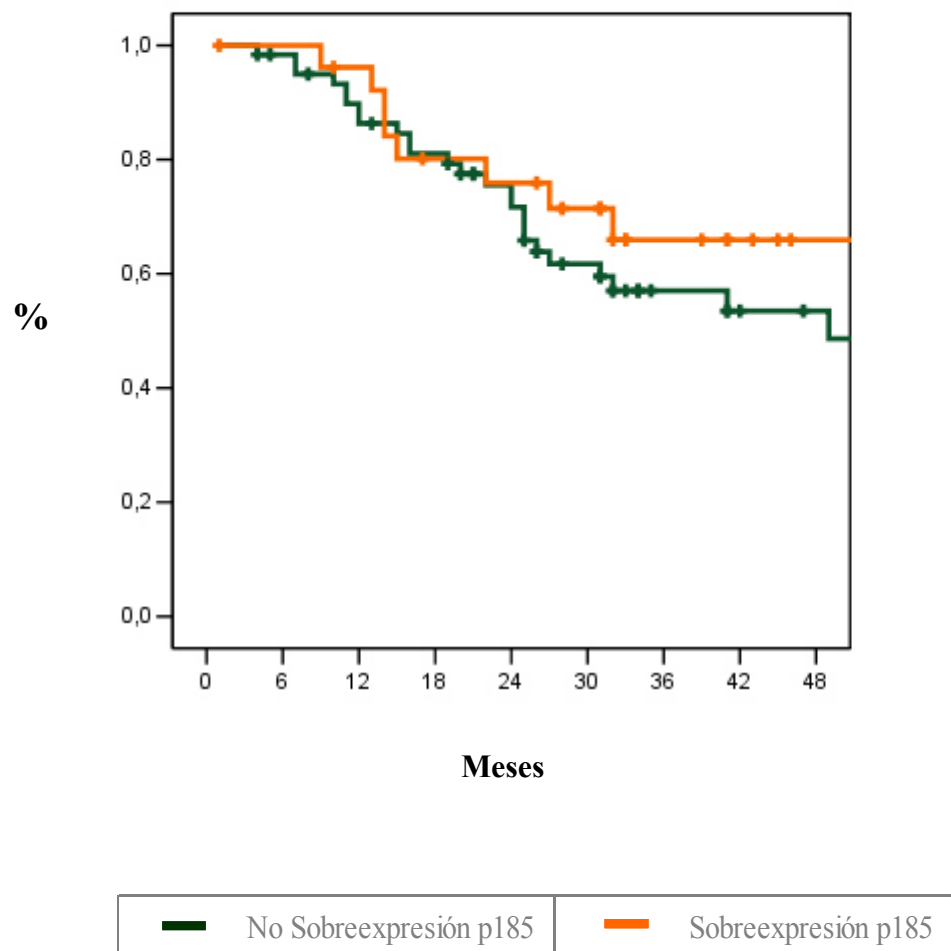


Figura 47. Supervivencia de los tumores que sobreexpresan p53 en relación con los niveles de p185.

B.- Los resultados obtenidos en el estudio de recidiva de la enfermedad se exponen en la tabla XX:

Tabla XX . Modelo de riesgos proporcionales de Cox. Recidiva de la enfermedad.

Variable	HR (IC 95%)	p
Epidermoide	0,38 (0,21-0,70)	0,002*
Estadio tumoral		
I	1	
II	2,42 (1,17-5,04)	0,018*
IIIA	3,64 (1,82-7,27)	< 0,001*
IIIB	2,36 (0,27-20,62)	0,44
CEA >5 ng/ml	No pronóstico	
CA 12.5 >15 U/ml	1,83 (0,95-3,55)	0,07
Sobreexpresión p53	1,83 (0,96-3,50)	0,07
Sobreexpresión p185	1,06 (0,56-1,99)	0,869
RT/QT adyuvantes	No pronóstico	

* Las variables incluidas en el modelo fueron: tumor epidermoide, estadio tumoral TNM, CEA, CA 12.5, sobreexpresión de p53, sobreexpresión de p185, Radioterapia y Quimioterapia adyuvantes.

La variable tipo histológico epidermoide presenta un efecto pronóstico protector significativo.

Los niveles séricos de CA 12.5 superiores ó iguales a 15 U/ml y la sobreexpresión de la proteína p53 muestran una tendencia significativa de mal pronóstico ($p= 0.07$).

Los estadios tumorales II y IIIA constituyen factores independientes de mal pronóstico en relación con la aparición de recidiva de la enfermedad.

La sobreexpresión de p53 es un factor de mal pronóstico independiente pero sin encontrarse una relación de sinergismo entre p53 y p185.

El CEA y la sobreexpresión de la proteína p185 no influyen.

El tratamiento adyuvante con radioterapia y/ó quimioterapia no constituyó efecto pronóstico.

V.- DISCUSIÓN

El cáncer de pulmón constituye un problema sanitario en los países desarrollados por su elevada incidencia y mortalidad. Sabemos que el factor etiológico principal es el tabaquismo, responsable del 90% de los casos.

La mayor parte de los tumores malignos de pulmón son de origen epitelial y se han clasificado en dos grandes grupos: los cánceres de pulmón microcíticos (CPM) y los no microcíticos (CPNM), basada esta división tanto en sus características anatómo-patológicas como en sus diferentes indicaciones terapéuticas y pronóstico.

La supervivencia del paciente con cáncer de pulmón se relaciona esencialmente con el estadio de la enfermedad, disminuyendo al avanzar dicho estadio. La cirugía continúa siendo el tratamiento más efectivo y potencialmente curativo para el cáncer pulmonar no microcítico, aunque lamentablemente sólo se puede realizar en menos de un 25% de pacientes debido al diagnóstico tardío del tumor.

En la clínica diaria observamos que pacientes con el mismo estadio tumoral y tipo histológico se comportan de manera diferente en cuanto a supervivencia, índice de recidiva y respuesta al tratamiento. El estudio de la biología molecular del cáncer ha abierto un nuevo campo en este intento de caracterizar mejor a los tumores y ayudarnos a esclarecer el distinto comportamiento de los mismos. Últimamente se han realizado hallazgos en este sentido que han sido trasladados a la clínica con importantes aplicaciones al diagnóstico precoz, monitorización, prevención, así como en la identificación de los pacientes que pueden presentar una mejor respuesta a determinadas terapias en el cáncer de pulmón.

En este contexto muchos trabajos se han publicado con el propósito de incorporar a la práctica clínica diferentes marcadores pronósticos, pero la interpretación e

integración de sus resultados se ven enturbiados por problemas metodológicos. Muchos de los análisis son retrospectivos, en los que el valor del seguimiento es menor y donde prejuicios de selección no pueden ser evitados.

En 1996, un sistema de clasificación, TMUGS, fue propuesto para evaluar el valor clínico de los nuevos factores pronósticos; en él, la calidad relativa de los estudios era el punto crítico. El mayor nivel de evidencia se produce en los estudios prospectivos, lo ideal es el análisis de más de un marcador y el poder estadístico de los factores pronósticos debe ser estudiado mediante un estudio multivariante. Por todo ello, se diseñó un estudio multicéntrico de cohorte clínica prospectivo. La incorporación de varios centros hospitalarios nos permitió alcanzar una muestra poblacional mayor, aunque puede incorporar sesgos clínicos; así, se controló la variabilidad entre observadores centralizando el estudio de los marcadores pronósticos en un centro.

Con este fin, en este proyecto de tesis se incluyen pacientes con diagnóstico clínico-patológico de carcinoma broncogénico no microcítico sometidos a tratamiento quirúrgico con intención curativa, analizando el valor pronóstico en relación con la supervivencia y el riesgo de recidiva (locorregional y/o metástasis) de los marcadores tumorales: CEA, CA 12.5 y la sobreexpresión de las proteínas p53 y p185. Escogiendo a pacientes con estadio clínico-patológico I, II y III, en los que el conocimiento de nuevos marcadores en relación al pronóstico presentan mayor rentabilidad.

La supervivencia global a 48 meses fue del 61% y la probabilidad de permanencia libre de la enfermedad del 55%. Teniendo en cuenta que se incluyeron tumores en estadio quirúrgico I, II, IIIA y IIIB resecados, dichas cifras se encuentran dentro de los rangos habituales de otros estudios (100,101).

Se recogieron 168 pacientes, con una edad media de 62 años, cifra similar a la de otras series. La distribución por sexos demostró una mayor frecuencia entre los hombres que en los estudios epidemiológicos generales (91% de varones y un 9% de mujeres) (4). Probablemente por el mayor consumo de tabaco en nuestra población masculina.

Todos los pacientes fueron incluidos en el estudio para tratamiento quirúrgico, siendo la lobectomía la técnica más empleada seguida de la neumonectomía con linfadenectomía mediastínica homolateral sistemática. Las segmentectomías y las resecciones atípicas se realizaron principalmente en tumores T1 y T2 N0 M0, y/o en pacientes con función pulmonar limitada que no podían tolerar una resección mayor. Merece la pena destacar el índice de neumonectomías realizadas (31,5%), cifras que se encuentran en el límite superior de la literatura (10-30%), con cifras de mortalidad postoperatoria del 8%, encontrándose dentro de los rangos habituales (3,2-13,4%) (104).

El tamaño tumoral fue superior a los dos centímetros en la gran mayoría de los casos (94,6%). Al comparar la supervivencia global de los pacientes atendiendo al tamaño del tumor se ha observado en estudios recientes diferencias en los puntos de corte de 2, 3, 5 y 7 cm. (260). Por tanto, sin modificar el punto de corte de 3 cm. entre los T1 y T2, se pueden subdividir los tumores T1 en dos grupos pronósticos: los de 2 cm. ó más pequeños (T1a) y los de un tamaño superior a 2cm. e inferior a 3 cm. (T1b). La supervivencia a los 5 años en los tumores clasificados anatomopatológicamente como T1a fue del 83,7% y en los T1b del 76% (261). En nuestro trabajo no se planteó esta subdivisión en el momento de su realización, pero aunque no se llegó a la significación estadística ($p= 0,06$), debemos destacar que la supervivencia de los pacientes con tumores menores de 2 cm. fue del 83% frente al 59% de los mayores ó

iguales a 2 cm. Como era de esperar, el índice de recidivas también fue mayor en los tumores de mayor tamaño.

En relación al tipo histológico, el más frecuente en nuestra serie fue el carcinoma epidermoide (63,7%), con una gran diferencia respecto a los adenocarcinomas; estos resultados son diferentes a los de otros trabajos, en los que estas diferencias son pequeñas ó incluso se invierten (36,45). Revisando la literatura, los adenocarcinomas son los más frecuentes en E.E.U.U. y en Japón, sin embargo en Europa y en otros países el epidermoide es el que prevalece. Aunque su explicación no está del todo clara, se atribuye al cambio en el hábito tabáquico. En relación al pronóstico podemos observar que, aunque las diferencias entre los epidermoides y los adenocarcinomas en la supervivencia no son importantes, los tumores con tipo histológico de adenocarcinoma presentan un intervalo libre de enfermedad menor que los demás estadísticamente significativo (**p= 0,004**), en relación con su mayor índice de metástasis linfáticas y a distancia en el momento de su diagnóstico. Como en otros trabajos, el pequeño tamaño muestral de los tipos histológicos que no son ni epidermoides ni adenocarcinomas no permite extraer conclusiones valorables.

Los tumores fueron, en su mayoría, bien ó moderadamente diferenciados. Además, como era de esperar, presentaban mejor pronóstico y menor índice de recidiva que los pobremente diferenciados.

Según el estadio tumoral, $\frac{3}{4}$ partes de los tumores del estudio se encontraban en estadios I y II, y el resto en estadio IIIA; sólo un pequeño número de los tumores se clasificaron tras la cirugía como estadio IIIB. Estos resultados son similares a los de otros estudios. Podemos destacar que, según las últimas publicaciones al respecto (100), de los cinco pacientes enclavados como estadio IIIB, tres lo eran por T4 (otro nódulo en

el mismo lóbulo que el tumor principal) y podríamos pensar en incluirlos como T3 y como eran N1 ó N2, en el estadio IIIA. En relación a la supervivencia y al intervalo libre de enfermedad, disminuyen según avanza el estadio tumoral, datos que son estadísticamente significativos ($p < 0,001$ y $p = 0,001$), y que se relacionan con los resultados habituales de la literatura. Además el riesgo de fallecer por cáncer no microcítico de pulmón en estadio IIIA, es 4,16 veces mayor ($p < 0,001$), y el riesgo de recidiva en los estadios II y IIIA de 2,42 ($p = 0,018$) y de 3,64 ($p < 0,001$) veces mayor, respectivamente. Así se demuestra una vez más que el estadio tumoral es uno de los factores pronósticos más importantes en el carcinoma de pulmón, empeorando tanto la supervivencia como el índice de recidiva al aumentar el mismo.

El tratamiento adyuvante con radioterapia y/o quimioterapia se indicó en la gran mayoría de los casos en los estadio tumorales II y IIIA, siguiendo los protocolos de cada hospital. La supervivencia y el intervalo libre de enfermedad mejoraron en los pacientes sometidos a quimioterapia, al igual que en otros trabajos de la literatura (108), además este beneficio se observó sobretodo en pacientes en estadio IB y II. Sin embargo, en los que se empleó radioterapia postoperatoria, el pronóstico fue peor en el estadio II y mejor en el IIIA, resultado que podría deberse al pequeño tamaño muestral de nuestra serie, al efecto deletéreo de la radioterapia y/o a la escasa estandarización del tratamiento en pacientes en estadio II.

ANTÍGENO CARCINOEMBRIONARIO (CEA):

Aunque ha sido considerado un marcador más específico de los tumores del aparato digestivo, en particular del colon (121), se ha comprobado que está presente también en el suero de pacientes portadores de otras neoplasias como las de pulmón. Aumenta también en otras patologías como las enfermedades inflamatorias del intestino (Enfermedad de Crohn y Colitis Ulcerosa), en el 50% de las pancreatitis, y en el 20-40% de las colecistitis sin colangitis.

En nuestro estudio los pacientes han presentado cifras en suero mayores ó iguales a 5 ng/ml en un 27,6% frente al 72.4% con niveles inferiores al punto de corte. Similares a otros trabajos (128,129).

Se han detectado niveles de CEA mayores ó iguales a 5 ng/ml sobre todo en los tumores de tamaño elevado y en aquellos con menor grado de diferenciación, relacionándose estos datos con otros trabajos de la literatura (129, 131,132).

En relación al tipo histológico, niveles elevados de CEA los hemos encontrado preferentemente en los tumores con estudio histológico de células grandes y en los adenocarcinomas (130,133).

Analizando el estadio tumoral, las cifras de CEA iguales ó mayores de 5 ng/ml se encuentran con más frecuencia en los estadios avanzados como el IIIA; sin embargo esto no sucede en los tumores IIIB, seguramente por el escaso número de pacientes de este grupo. Todos estos resultados no han sido estadísticamente significativos. Sin embargo, cuando relacionamos el estadio II con el IIIA, encontramos asociación estadísticamente significativa (**p< 0,05**) (130,131). Teniendo en cuenta al estadio IIIA de forma aislada, los tumores N2 presentan cifras de CEA iguales ó mayores de 5 ng/ml con mucha más

frecuencia que el resto de tumores de este estadio tumoral, siendo este resultado estadísticamente significativo (**p= 0,04**).

En cuanto a la supervivencia global, parece seguir la línea de otros estudios (130,131,132,133), siendo mayor en los tumores con cifras de CEA inferiores a 5 ng/ml, aunque las diferencias no son importantes ni significativas.

Hemos encontrado un mayor riesgo de recidiva (local y/o metástasis) en los tumores con cifras elevadas de CEA, aunque con pequeñas diferencias. De forma estratificada, se ha observado que dentro de los tumores de pequeño tamaño (menores de 2 cm.), existe un menor riesgo de recidiva en aquellos que presentaban cifras de CEA menores de 5 ng/ml, con significación estadística (**p= 0,025**).

Así mismo, cuando estudiamos los tumores con sobreexpresión de p53, presentan un menor índice de recidiva aquellos cuyas cifras de CEA son menores de 5 ng/ml., con tendencia estadística.

Varios trabajos han intentado dar al CEA un valor pronóstico en relación con los carcinomas microcíticos de pulmón. En nuestro estudio, se observa una vez más, que los niveles séricos preoperatorios de CEA iguales ó superiores a 5 ng/ml determinan un factor pronóstico negativo (125). Además, estas cifras elevadas se evidencian sobretudo en los tumores de mayor tamaño, en los adenocarcinomas, en los menos diferenciados y en los estadios avanzados, situaciones todas ellas de peor pronóstico en nuestra serie y en la literatura. Así, podría ser útil para el seguimiento de los pacientes (122): control postoperatorio y de respuesta a la quimioterapia (123,124). Asociado a otros parámetros

clínicos y de laboratorio ha sido utilizado en la determinación de presencia de metástasis (126).

CARBOHIDRATO ANTÍGENO CA 12.5 (CA 12.5):

Un aspecto destacado del CA 125 es su elevada especificidad, ya que menos de 1% de los sujetos sanos presentan concentraciones elevadas de suero (154,155,156). Además, menos del 10% de los pacientes con patología pulmonar benigna presentan niveles séricos elevados (154,155).

En nuestro trabajo, las cifras de CA 12.5 iguales ó superiores a 15 U/ml se obtuvieron sólo en un 14.1% de los pacientes, cifras bajas en comparación a otros estudios (149,154). En este sentido, se ha planteado en algunos trabajos un punto de corte para el CA 12.5 menor (258).

Las cifras de CA 12.5 iguales ó superiores a 15 U/ml se encontraron más frecuentemente entre los tumores de tamaño elevado. También en los pobremente diferenciados, reflejando un factor de mal pronóstico (**p< 0,05**).

En relación al tipo histológico, los resultados no se correlacionan con los de otros trabajos, en los que se observa con más frecuencia, hasta un 90%, la elevación de CA 12.5 en los tumores de células grandes, seguidos de los adenocarcinomas (160,161). Sin embargo en nuestra serie, los tumores de células grandes presentan niveles de CA 12.5 iguales ó superiores a 15 U/ml en un 10% y los adenocarcinomas en un 15,8%.

El CA 12.5 refleja en nuestro estudio correctamente la masa tumoral en el carcinoma pulmonar no microcítico, de forma que la concentración en suero y el tanto por ciento de pacientes con valores prequirúrgicos patológicos están directamente relacionados con el estadio TNM, lo mismo que en la mayoría de los trabajos (154,158,159,160).

Estos resultados son estadísticamente significativos ($p < 0,05$) cuando comparamos el estadio I frente al IIIA; sin embargo, teniendo en cuenta al estadio IIIA de forma aislada, sólo los tumores N2 presentan cifras de CA 12.5 iguales ó superiores a 15 U/ml, siendo este resultado estadísticamente significativo ($p = 0,017$).

En cuanto a la supervivencia global, nuestros resultados parecen seguir la misma línea que la de la mayoría de los estudios; así, los pacientes con cifras séricas de CA 12.5 iguales ó superiores a 15 U/ml presentan una menor supervivencia, siendo estadísticamente significativo ($p = 0,004$).

Además, se han observado otras relaciones destacadas en el estudio estratificado, convirtiendo al CA 12.5 en un factor predictivo muy importante para seleccionar pacientes de alto riesgo dentro de los diferentes subgrupos.

Así, dentro del grupo de los tumores de mayor tamaño, la supervivencia fue claramente menor en aquellos cuyas cifras de CA 12.5 preoperatorias resultaron iguales ó mayores de 15 U/ml ($p = 0,01$). Estos mismos resultados se observaron en los tumores epidermoides ($p < 0,001$), los bien diferenciados ($p = 0,03$) y los estadios IIIA ($p = 0,03$).

En cuanto a la relación del CA 12.5 con los otros marcadores, se observa también una menor supervivencia entre aquellos pacientes que presentaron cifras de CA 12.5 iguales ó mayores a 15 U/ml preoperatorios y niveles normales de CEA, p53 y p185. Estos

resultados son estadísticamente significativas, con $p= 0,03$, $p= 0,002$ y $p= 0,001$ respectivamente. Estos datos reflejan la independencia del marcador CA 12.5 como factor de mal pronóstico en los carcinomas de pulmón no microcíticos.

En relación con los resultados mostrados en otros estudios (162), también hemos encontrado un índice global de recidiva (local y/o metástasis) mayor entre los pacientes con cifras de CA 12.5 elevadas, con significación estadística ($p= 0,01$).

En el análisis estratificado se observa que en los tumores epidermoides, existe un mayor índice de recidiva en aquellos cuyos niveles de CA 12.5 son elevados ($p= 0,006$). Así mismo, el marcador sérico CA 12.5 se convierte en factor independiente en relación al intervalo libre de enfermedad respecto de los otros tres marcadores, aunque sólo estadísticamente significativo con el p53 ($p= 0,03$), y el p185 ($p= 0,004$).

Los niveles de CA 12.5 reflejan el grado de agresividad biológica tumoral del cáncer de pulmón no microcítico. Además se recomienda utilizar este marcador como parámetro complementario para la clasificación por estadios.

Al margen del tipo histológico, el sexo y la edad, se ha descubierto que el CA 12.5 es un marcador tumoral con valor pronóstico en el grado de supervivencia de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón no microcítico, y cuya información es independiente de la proporcionada por los otros factores. En nuestro trabajo concluimos que el riesgo de muerte es 2,43 veces superior en los pacientes con cifras séricas preoperatorios iguales ó superiores a 15 U/ml, con significación estadística ($0,012$). El riesgo de recidiva es de 1,83 veces más, con tendencia estadística ($p= 0,07$).

SOBREEXPRESIÓN DE P53 (P53):

El gen supresor p53 mantiene la integridad genómica frente a las lesiones del DNA de radiaciones δ ó ultravioletas. Una lesión del DNA ó la hipoxia celular dan lugar a un rápido incremento en los niveles de proteína p53, que actúa como un factor de transcripción secuencia-específico regulando la activación de otros genes como p21, mdm2, gadd45 ó bax, colaborando así en la regulación de la transición celular G1/S, G2/M y de la apoptosis. La disfunción de p53 permite la supervivencia de células dañadas genéticamente, creándose así el ambiente adecuado para el acúmulo de múltiples mutaciones y la subsecuente evolución hacia la malignidad.

Las mutaciones del gen p53 se manifiestan en su mayoría por la génesis de una proteína anómala, que se puede reconocer fácilmente debido al aumento de su vida media producido probablemente por una disminución en su catabolismo. Basándose en ello, se han desarrollado los estudios inmunohistoquímicos, que permiten la identificación de las mutaciones con un método barato, rápido, aparentemente eficaz y fácilmente reproducible por otros grupos (234). El mayor problema de los métodos inmunohistoquímicos es su incapacidad para discriminar entre la forma mutada de p53 y el aumento de los niveles de wild type-p53 (259). Las diferencias en la selección de los pacientes, en las técnicas de laboratorio, en los tipos de anticuerpos empleados y en los diferentes puntos de corte, pueden explicar los diferentes resultados respecto al valor pronóstico del gen p53.

Los resultados de nuestro trabajo demostraron la sobreexpresión de la proteína p53 en un 60,8% de los pacientes, datos similares ó algo superiores a los encontrados en la literatura (193,235,236).

En relación con las variables del estudio, la sobreexpresión de la proteína p53 la evidenciamos principalmente entre los tumores de gran tamaño, en los adenocarcinomas, en los epidermoides y en los tumores mejor diferenciados, aunque sin significación estadística. Generalmente se asocian las alteraciones en p53 con los tumores epidermoides (242), lo que demuestra la posible inducción de mutaciones por el humo del tabaco, carcinógeno estrechamente ligado al carcinoma escamoso. Sin embargo no suele ser frecuente la sobreexpresión de p53 en los bronquioalveolares como ha sucedido en nuestro trabajo. En relación con el grado de diferenciación, nuestros resultados no se observan en otros trabajos, ello puede deberse a que las técnicas de laboratorio sean más fiables en los tumores diferenciados ó que en los tumores poco diferenciados existan otros mecanismos del ciclo celular (p16, p19, Rb) que puedan suplir el efecto de la alteración en p53.

En relación al estadio tumoral, la sobreexpresión de p53 se observó más frecuentemente en el estadio II seguido del III. Únicamente si nos fijamos en los tumores en estadio IIIA, observamos diferencias estadísticamente significativas; así, la sobreexpresión de p53 se demostró sobretodo entre los N2, con **p= 0,04** (336,337).

En cuanto a la supervivencia global, los tumores con sobreexpresión de la proteína p53 tuvieron una menor supervivencia (57% versus 68%), aunque sin ser estadísticamente significativa esta diferencia.

Los resultados de nuestro estudio en relación a la recidiva de la enfermedad demostraron diferencias estadísticamente significativas; así, en los tumores que

sobreexpresaron la proteína p53 tuvieron un mayor índice de recidivas, con $p= 0,025$ (193,235).

En el estudio estratificado se observó una tendencia estadística a la recidiva en tumores de células grandes, en los indiferenciados, en los que presentaron niveles de CEA iguales ó mayores a 5 U/ml y en aquellos que no sobreexpresaron p185, con $p= 0,05$, cuando se sobreexpresa p53 (236).

Merece la pena destacar que en el estudio multivariante se observó una tendencia significativa de mal pronóstico, con un riesgo de recidiva 1,83 veces mayor ($p= 0,07$), cuando exista sobreexpresión de la proteína p53.

Mucho se ha escrito sobre la implicación pronóstica de p53 en distintos tumores. Si la inactivación del gen supone la aparición de un estado de permisividad tumoral y el acúmulo de múltiples mutaciones génicas, no es descabellado intuir que los tumores así desarrollados puedan ser más agresivos. Los genes supresores que más frecuentemente están silenciados ó alterados en el cáncer de pulmón son: el p53, p16, RAR beta (receptor del ácido retinoico), y FHIT (triada histidina frágil). El conocimiento del papel de los genes supresores en la patogénesis del carcinoma broncogénico ha permitido la realización de varios ensayos preclínicos y clínicos de reemplazamiento génico. Los estudios preclínicos iniciales permitieron confirmar que p53 puede inhibir el crecimiento de las células cancerosas de pulmón en humanos con p53 mutado, utilizándose habitualmente como vectores los adenovirus y los retrovirus. Con posterioridad se han realizado diversos ensayos con p53 vehiculizado con adenovirus inoculado directamente en el tumor, por vía broncoscópica ó aguja fina con control por TAC. Este tratamiento era complejo porque precisaba la administración intratumoral y

además producía un bajo índice de respuestas. Más recientemente han aparecido trabajos de investigación asociando terapia sustitutiva de p53 con radio ó quimioterapia. Esta combinación está basada en una teórica inhibición sinérgica del crecimiento tumoral en estudios preclínicos. Se han realizado estudios con p53 en adenovirus junto con cisplatino ó asociado a radioterapia en cáncer de pulmón no microcítico, con resultados esperanzadores. Las principales limitaciones de la terapia génica son la selección del gen óptimo y la manera de administración.

SOBREEXPRESIÓN DE P185 (c-erbB-2):

El gen c-erbB-2 sintetiza la proteína p185 de gran homología con el receptor de EGF (factor de crecimiento epidérmico), y se expresa en el cáncer de pulmón no microcítico. Se sobreexpresa en las fases iniciales de la transformación tumoral hasta en el 25% de los casos.

En nuestro trabajo se ha encontrado sobreexpresión de p185 en el 25,9% de los tumores estudiados, similar a otros estudios (185).

Se observa sobreexpresión de p185 con más frecuencia entre los tumores mayores ó iguales a 2 cm., sin presentar diferencias entre los distintos grados de diferenciación.

En cuanto a su relación con los tipos histológicos, se observó sobreexpresión de p185 con mayor frecuencia en los adenocarcinomas que en los epidermoides (32,4% versus 23,5%), resultados en la misma línea que en la literatura aunque con diferencias menores: un 30% de los adenocarcinoma y un 2% de los epidermoides según algunos trabajos, otros autores comunican otras cifras como: 81% y 44% (201), 30% y 14%

(195), 35% y 33% (202) respectivamente. Se debe destacar la elevada proporción de sobreexpresión de p185 en los adenoescamosos, aunque el escaso tamaño muestral no permite sacar conclusiones estadísticamente significativas.

En relación al estadio tumoral, las cifras de sobreexpresión de p185 para los estadios I, II y IIIA fueron 17,1%, 41% y 28,1% respectivamente, con asociación estadística (**p= 0,041**); decir que estas diferencias son más claras si comparamos el estadio I con el II. Diferentes resultados a los encontrados en otros estudios; así se observa una mayor sobreexpresión de la proteína p185 en estadios II/III (81 y 87%) que en los I (50%) (201), datos semejantes son obtenidos por otros autores (203).

La supervivencia global de los tumores que sobreexpresen la proteína p185 fue ligeramente mayor (63% versus 61%), pero sin asociación estadística. Resultado similar al observado en otros estudios (186,187,188,189,190,191,192), aunque diferentes de los hallados por otros (193,194,195,196,197,198,199,200). Sin embargo se ha observado un sinergismo con la proteína p53, de tal manera que cuando ésta está sobreexpresada, el efecto protector de la sobreexpresión de p185 aumenta de forma clínica y estadísticamente relevante ($p= 0,01$), sobre todo en los estadios I y IIIA (**p= 0,06** y **p= 0,027**, respectivamente).

En relación con el riesgo de recidiva, de forma global se evidenció un mayor índice en los tumores con sobreexpresión de p185, sin asociación estadística.

La familia HER incluye cuatro subtipos de receptores (ErbB1 a ErbB4), de los que los dos primeros han sido detalladamente estudiados. El receptor del factor de

crecimiento epidérmico (EGFR) está sobreexpresado en varios tumores, asociándose con un peor pronóstico en algunos estudios. En el carcinoma de pulmón no microcítico, el estudio de EGFR como potencial diana terapéutica es del máximo interés. Hay numerosos bloqueadores de EGFR que están siendo evaluados. El trastuzumad es un anticuerpo anti-EGFR frente a ErbB-2 que está aprobado en el tratamiento de cáncer de mama avanzado que sobreexpresa el encogen HER-2/neu. Aunque los estudios en fase II de trastuzumad en combinación con quimioterapia (carboplatino-paclitaxel ó cisplatino-gemcitabina) son prometedores en los pacientes con carcinoma no microcítico de pulmón que sobreexpresa ErbB-2, esta expresión no es tan frecuente como en los carcinomas de mama y, por tanto, el uso de trastuzumad en esta neoplasia sigue siendo limitado.

En resumen, en nuestro estudio los carcinomas no microcíticos de pulmón se observan con más frecuencia en los varones, siendo los tumores epidermoides más frecuentes que los adenocarcinomas, en probable relación, todo ello, con el hábito tabáquico de nuestra población. Una vez más se demuestra que el factor pronóstico principal en relación con la supervivencia y el intervalo libre de enfermedad es el estadio tumoral en el que se encuentra el tumor en el momento del diagnóstico. Los tumores epidermoides presentan un efecto protector en relación al riesgo de recidiva. El efecto beneficioso del tratamiento adyuvante con quimioterapia se evidencia en los estadios II y IIIA. Los niveles de CEA iguales ó mayores a 5 ng/ml los encontramos sobretodo en los tumores tipo adenocarcinomas y de células grandes, así como en el estadio IIIA. Sin tener valor pronóstico independiente en nuestro estudio el CEA. El CA

12.5 con cifras iguales ó mayores a 15 U/ml se han encontrado con más frecuencia en los adenocarcinomas y en los de células grandes; así también en relación con el tamaño tumoral y el estadio avanzado. En relación a la supervivencia e intervalo libre de enfermedad, el nivel de CA 12.5 mayor ó igual a 15 U/ml se ha mostrado como factor pronóstico independiente. La sobreexpresión de la proteína p53 se ha demostrado sobre todo en los tumores epidermoides y en el estadio tumoral avanzado. En nuestro análisis, la p53 es factor pronóstico en relación con un mayor riesgo de recidiva tumoral. La sobreexpresión de la proteína p185, se ha visto en los adenocarcinomas y con el estadio tumoral avanzado. Se ha evidenciado un sinergismo entre p53 y p185, de tal modo que, cuando p53 se sobreexpresa, p185 tiene un efecto protector en relación con la supervivencia, sobre todo en los estadio I y IIIA.

El interés del presente trabajo no se ha limitado a la simple evaluación como factor pronóstico de una serie de marcadores y alteraciones genéticas, sino que subyacen una serie de ideas que van más allá de los meros datos estadísticos.

El cáncer de pulmón es uno de los tumores más frecuentes, por lo que cualquier avance en su conocimiento, tratamiento y seguimiento van a suponer un gran beneficio en la supervivencia de muchas personas. Aproximadamente el 80% de todas las neoplasias pulmonares van a precisar en un momento determinado, un tratamiento sistémico, ya sea porque el diagnóstico se hace en la etapa de estadio avanzado ó debido a la presencia de una recidiva tras la cirugía.

La intención de esta tesis es investigar algo más en el complicado mundo de la carcinogénesis y los marcadores tumorales en el cáncer no microcítico de pulmón,

aportando una pequeña información que, junto a la ya existente en otros trabajos, pueda permitir obtener conclusiones de peso.

El conocimiento molecular de los tumores pulmonares nos permite mejorar nuestro conocimiento sobre los estudios de epidemiología, las campañas de detección precoz, la quimioprofilaxis, mejorar el diagnóstico, perfeccionar la evaluación pronóstica, seleccionar la terapia adecuada e incluso en un futuro ampliar los tratamientos convencionales a terapias moleculares.

En cuanto al pronóstico indicar que es importante la predicción de la aparición de recidiva precoz ó metástasis con el fin de diseñar el seguimiento de los pacientes, así como para seleccionar los candidatos a quimioterapia y/ó radioterapia e incluso quimioprofilaxis en un futuro.

En relación al tratamiento, los conocimientos obtenidos en la investigación básica sobre los mecanismos de acción de los oncogenes y genes supresores han abierto un campo de posibles nuevas dianas terapéuticas. Tradicionalmente los ensayos de agentes citotóxicos centrados en la capacidad de los compuestos para inhibir directamente la síntesis de DNA, RNA ó proteínas, han sido y en su mayoría siguen siendo, rastreos al azar. Por el contrario, tras la dilución de los mecanismos íntimos del desarrollo tumoral, la búsqueda de agentes terapéuticos se convierte en un proceso más racional. En conjunto, la terapia de diana molecular (*targeted therapy*) son fármacos citostáticos, cuya acción es la inhibición de los mecanismos de señalización celular y otros caminos biológicos implicados en la génesis del tumor.

En el cáncer de pulmón se están investigando inhibidores de la señal de transducción, inhibidores de la angiogénesis, tratamientos dirigidos a bloquear el

receptor del factor de crecimiento epidérmico, y otras moléculas diseñadas a partir de estudios genómicos.

La llamada terapia génica se ha desarrollado contra la expresión ó anomalía de la expresión de determinados oncogenes ó genes supresores. Esta terapia puede definirse como la introducción de material genético en las células de un paciente con intención de lograr un beneficio terapéutico. En el material genético generalmente no solamente se incluye el gen diana, sino que éste se acompaña de una serie de genes y secuencias reguladoras que controlan su expresión. La terapia génica se puede realizar ex vivo ó in vivo, extrayendo células, tratándolas y reimplantándolas en el primer caso, y actuando directamente sobre el paciente en el segundo.

En cuanto a las vacunas en el cáncer de pulmón, su objetivo es el de incrementar la respuesta celular inmune y prolongar la supervivencia. Se han utilizado varios procedimientos de producción: administración de células tumorales alogénicas ó vacunas de antígenos antiidiotipos administrados con adyuvantes inmunes (BEC-2). Con células autólogas modificadas se han realizado varios estudios clínicos como tratamiento preventivo en los cánceres de pulmones resecaados, observando un ligero incremento en el tiempo hasta la recaída. Con vacunas antiidiotipo BEC-2 administradas en pacientes en remisión completa tras una quimioterapia previa, se consiguió una supervivencia estadísticamente superior que la de los controles históricos.

El tratamiento del cáncer de pulmón con quimioterapia citotóxica ha llegado a su *plateau*, en lo que respecta a su eficacia para mejorar la tasa de respuestas y la duración de las mismas. Sin embargo, el mejor entendimiento de la biología tumoral ha permitido desarrollar nuevos fármacos dirigidos a dianas moleculares específicas. Estas nuevas

terapias están obteniendo resultados muy prometedores que pueden repercutir en la supervivencia de los pacientes con neoplasias de pulmón.

Han transcurrido más de 100 años para que el viejo sueño de Ehrlich, la ‘‘Bala Mágica’’ sea una realidad en el tratamiento de un gran número de enfermedades, y de manera destacada en el tratamiento de los pacientes con cáncer.

VI.- CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en nuestro estudio son las siguientes:

1. En nuestra serie el 27,6% de los pacientes intervenidos de carcinoma no microcítico de pulmón presentan concentraciones séricas preoperatorios de CEA iguales ó superiores a 5 ng/ml y el 14,1% de CA 12.5 iguales ó superiores a 15 U/ml.
2. Los pacientes intervenidos de carcinoma no microcítico de pulmón presentan en muestras tisulares sobreexpresión de la proteína p53 en el 60,8% y sobreexpresión de la proteína p185 en el 25,9%.
3. Existe asociación estadística significativa entre los marcadores séricos (CEA y CA 12.5) y el estadio tumoral IIIA en relación con la afectación ó no por N2. Se observan concentraciones séricas elevadas de los dos marcadores con más frecuencia en los tumores en estadio IIIA por N2.
4. No se establece ninguna asociación entre la sobreexpresión de p53 y las demás variables pronósticas. Sin embargo, sí se establece asociación estadística significativa entre la sobreexpresión de p185 y el estadio tumoral, observándose con más frecuencia esta sobreexpresión en los estadios II y IIIA.

5. Los pacientes que presentan concentraciones preoperatorias de CA 12.5 iguales ó mayores de 15 U/ml, tienen una supervivencia global menor, estadísticamente significativa, tras el tratamiento quirúrgico con intención curativa. No se establece ninguna relación entre los demás marcadores del estudio y la supervivencia.
6. Los pacientes con concentraciones séricas preoperatorias de CA 12.5 iguales ó mayores de 15 U/ml y aquellos tumores con sobreexpresión de la proteína p53, presentan un riesgo de recidiva mayor, estadísticamente significativo. Los otros dos marcadores del estudio (CEA y sobreexpresión de p185) no presentan relación estadística con el riesgo de recidiva.
7. En el estudio multivariante de nuestra serie, los pacientes con niveles séricos de CA 12.5 iguales ó mayores de 15 U/ml tienen 2,43 veces más de riesgo de fallecer por cáncer no microcítico de pulmón y aquellos que se presentan en estadio IIIA de 4,16 veces más, tras ser intervenidos con intención curativa, siendo estadísticamente significativo.

Cuando los pacientes presentan sobreexpresión de p53, la sobreexpresión de p185 determina una mayor supervivencia, sobretodo en tumores en estadios I y IIIA.

8. En el estudio multivariante, los pacientes con diagnóstico histológico de epidermoide presentan un mayor intervalo libre de enfermedad; por el contrario, los tumores en estadio II y en estadio IIIA presentan un riesgo de recidiva 2,42 y 3,64 veces mayor respectivamente tras ser intervenidos con intención curativa de carcinoma no microcítico de pulmón, con significación estadística. La sobreexpresión de p53 ó los niveles iguales ó mayores a 15 U/ml de CA 12.5 se asocian, con una tendencia significativa, a 1,83 veces más riesgo de recidiva.

VII.- BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
2. Ferlay J, Autier P, Boniol M, Heanue M, Colombet M, Boyle P. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 2007; 18: 581-592.
3. Boyle P, Gandini S, Gray N. Epidemiology of lung cancer: a century of great success and ignominious failure. En: Hansen HH (ed). *Textbook of lung cancer*. IASLC. London. Martin Dunitz 2000; 13-25.
4. Alberg AJ, Brock MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3171-3185.
5. Miñarro R, Black RJ, Martínez C, Navarro C, Garan I, Izarzugaza I. Incidencia y mortalidad por cáncer en España. Patrones y tendencias. Lyon: Internacional Agency for Research on Cancer: 2000. Technical Report nº 36.
6. Ministerio de Sanidad y Consumo. La situación del cáncer en España 2005.
7. Alberg JA, Samet JM. Epidemiology of lung cancer. *Chest* 2003; 123: 21S-49S.
8. Peto R, López AD, Boreham J, Thun M, Health C. Mortality from tobacco in developed countries: indirect estimation from national vital statistics. *Lancet* 1992; 339: 1268-1278.
9. Alberg AJ, Ford JG, Samet JM: American College of Chest Physicians. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). *Chest* 2007; 132 (Suppl): 29S-55S.
10. Jansen-Heijnen MLG. Coebergh JW. Trends in incidence and prognosis of the histological subtypes of lung cancer in North America, Australia, New Zeland and Europe. *Lung Cancer* 2001; 31: 123-137.

11. Manino DM, Ford E, Giovino GA, Thun M. Lung cancer mortality rates in birth cohorts in the United States from 1960 to 1994. *Lung Cancer* 2001; 31: 91-99.
12. Khunder SA. Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis. *Lung Cancer* 2002; 31: 139-148.
13. Auerbach O, Stout AP, Hammond EC, Garfinkel L. Changes in bronchial epithelium in relation to cigarette smoking and in relation to lung cancer. *N Engl Med* 1961; 265: 253-267.
14. Kotin P. Carcinogenesis of the lung: Environment and host factors. En: Liebow AA and Smith DE (eds). *The lung*. Baltimore. Williams and Wilkins 1968; 203.
15. Lange P, Vestbo J. *Lung Cancer*. *Eur Respir Mon* 2000; 15: 92-104.
16. González CA, Agudo A. La industria del tabaco y la manipulación de la investigación científica. El caso del estudio de la iarc-oms sobre consumo pasivo de tabaco y cáncer de pulmón. *Med Clin* 2000; 115: 302-304.
17. González CA, Agudo A. Occupational cancer in Spain. *Environ Health Perspect* 1999; 107 Suppl 2: 253-258.
18. International Agency for Research on Cancer. Overall evaluations of carcinogenicity to humans. Lyon. 2001.
19. Rodríguez V, Tardón A, Kogevinas M, Prieto CS, Cueto A, Menéndez IA, Zaplana J. Lung cancer risk in iron and steel foundry workers: a nested case control study in Asturias, Spain. *Am J Ind Med* 2000; 38: 644-650.
20. Pezzoto SM, Poletto L. Occupation and histopathology of lung cancer: a case-control study in Rosario, Argentina. *Am J Ind Med* 2000; 38: 644-650.
21. Viera AJ. Radon and lung cancer. *Am Fam Physician* 2000; 62: 950-951.

22. Lubin JH, Boice JD. Lung cancer risk from residential radon: metaanalysis of eight epidemiological studies. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 49-57.
23. Agudo A, Esteve MG, Pallarés C, Martínez Ballarín I, Fabregat X, Malats N. Vegetable and fruit intake and the risk of lung cancer in woman in Barcelona (Spain). *Eur J Cancer* 1997; 33: 1256-1261.
24. Tokuhashi GK. Familial factors in human lung cancer and smoking. *Am J Public Health* 1964; 54: 24-33.
25. Thomas L, Doyle LA, Edelman MJ. Lung cancer in women: emerging differences in epidemiology, biology and therapy. *Chest* 2005; 128: 370-381.
26. Fraile EA, Awe RJ. Lung cancer in association with human immunodeficiency virus infection. *Cancer* 1992; 70: 432-436.
27. Solomon MD, Greenberg SD, Spjut HJ. Morphology of bronchial epithelium adjacent. *Med Pathol* 1990; 3: 684-687.
28. Roggli VI, Volmer RB, Greenberg SD, McGavran MH, Spjut HJ, Yesner R. Lung cancer heterogeneity: a blind and randomized study of 100 consecutive cases. *Hum Pathol* 1985; 16: 569-579.
29. Kreyberg L. Histological lung cancer types. A morphological and biological correlation. *Scandinavian University Books. Norwegian University Press*, 1962.
30. Tipos histológicos de tumores pulmonares. Clasificación histológica internacional de tumores nº 1. Ginebra: Organización Mundial de la Salud; 1967.
31. Histological Typing of lung tumors. 2ª ed. Internacional histological classification of tumors, nº 1. Geneva: World Health Organization; 1981.
32. Travis WD, Colby TV, Corrin B. World Health Organization classification of lung and pleural tumors, 3ª ed. Berlin. Springer-Verlag, 1999.

33. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC. The WHO Clasiffication of Tumors. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. Lyon. IARC Press, 2003.

34. Thomas CF Jr, Trazelaar HD, Jett JR. Typical and atypical pulmonary carcinoids: outcome in patients presenting with regional lymph node involvement. *Chest* 2001; 119: 1143-1150.

35. Travis WD, Rush W, Flieder DB, Kalk R, Fleming MV, Gol AA, Koss MN. Survival analysis of 200 pulmonary neuroendocrine tumors with clarigation and its separation from typical carcinoid. *Am J Surg Pathol* 1998; 22: 934-944.

36. Ortega L, Torres AJ, Balibrea JL. Características microscópicas y ultraestructurales del cáncer de pulmón. *Cirugía Española* 1989; 1: 3-11.

37. Tomashefski JF Jr, Connars AF Jr, Rosenthal ES, Hsine IL: Peripheral vs central squamous cell carcinoma of the lung. A comparison of clinical features, histopathology and survival. *Arch Pathol Lab Med* 1990; 114: 468-474.

38. Colby TV, Koss MN, Travis WD. Tumors of lower respiratory tract. *Atlas of Tumor Pathology* 1991; 18: 347-354.

39. Brambilla E, Travis WD, Colby TV, Corrin B, Shimosato Y. The New World Health Organization classification of lung tumors. *Eur Respir J* 2001; 18: 1059-1068.

40. Dulmet-Brender E, Jaubert F, Hunchon G. Exophytic endobronchial epidermoid carcinoma. *Cancer* 1986; 57: 1358-1364.

41. Funkino S, Morio S. Primary clear cell carcinoma of the lung: report or fan operative case. *Kyobu Geka* 1998; 51: 513-516.

42. Hammar SP, Bolen JW, Bockus D, Remington F, Friedman S. Ultrastructural and immunohistochemical features of common lung tumors: an overview. *Ultrastruct Pathol* 1985; 9: 283-318.
43. Brambilla E, Maro D, Veale D, Paramelle B, Brambrilla C. Basal cell (basaloid) carcinoma of the lung: a new morphologic and phenotypic entity with separate prognostic significance. *Hum Pathol* 1992; 23: 993-1003.
44. Geising KR, Stanley MW, Raab SS, Silverman JF, Abati A. Modern cytopathology. New York. Churchill Livingstone 2003.
45. Kabat CG and Winder EL: Lung cancer in non-smokers. *Cancer* 1989; 53:1214.
46. Sagawa M, Saito Y, Takahashi S, Usuda K, Kamma K, Sato M, Ota S, Nagamato N, Fujimura S, Nakada T. Clinical and prognostic assessment of patients with resected small peripheral lung cancer lesions. *Cancer* 1990; 66: 2653.
47. Teraski H, Niki T, Hirohashi S. Lung adenocarcinoma with mixed bronchiolo-alveolar and invasive components: clinicopathological features, subclassification by extent of invasive foci and immunohistochemical characterization. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 937-951.
48. Takei H, Asmura H, Matsuno Y. Large cell neuroendocrine carcinoma of the lung: a clinicopathologic study of eighty-seven cases. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002; 124: 285-292.
49. Sturm N, Rossi G, Brambilla E. Expresión of thyroid transcription factor-1 in the spectrum of neuroendocrine cell lung proliferatios with special interest in carcinoids. *Human Pathol* 2002; 33: 175-182.

50. Shimazaki H, Aid S, Tamai S. Lung carcinoma with rhabdoid cells: a clinicopathological study and survival analysis of 14 cases. *Histopathology* 2001; 38: 425-434.

51. Cavazza A, Colby TV, Travis WD. Lung tumors with a rhabdoid phenotype. *Am J Clin Pathol* 1996; 105: 182-188.

52. American Cancer Society. Report on the cancer-related health checkup: cancer of the lung 1980; 30: 199-207.

53. Fontana RS, Sanderson DR, Miller WE, Woolner LB, Tayler WF, Unlenhopp MA. The Mayo Lung Project. Preliminary report of "early cancer detection" phase. *Cancer* 1972; 30: 1373-1382.

54. Dominioni L, Imperatori A, Rovera F, Ochetti A, Torrigliotti G, Paulucci M. Stage I non small cell lung carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 2334-2340.

55. Yamauchi S. The association of adenocarcinoma and hemoptysis in pulmonary malignancies. *Respiration*. 2005; 72 (5): 499-503.

56. Dominioni L, Imperatori A, Rovera F, Ochetti A, Paulucci M, Dionigi G. Lung cancer screening in cigarette smokers in the province of Varese, Italy. *Cancer* 2000; 89: 2345-2348.

57. Libby DM., Henschke CI., Yankelevitz DF. The solitary pulmonary nodule: update 1995. *Am J Med* 1995; 99: 491-496.

58. Ratto GB, Capponi G, De Grandi R et al: Tumor markers II: Their significance in the follow-up of patients after radical resection of lung neoplasm. *Min Chir* 1990; 45: 1273-1280.

59. Schreiber E, Xing L. Image registration with auto-mapped control volume. *Med Phys* 2005; 32: 3493-3502.

60. Chao M, Schreibmann E, Li T, Wink N, Xing L. Automated contour mapping using sparse volume sampling for 4D radiation therapy. *Med Phys* 2007 Oct; 34: 4023-4029.

61. Heelan RT, Martini N, Westcott JW, Bains MS, Watson RC, Caravelli JF, Berkmen YM, Henschke CI, McCormack PM, McCaughan BC. Carcinomatous involvement of the hilum and mediastinum: computed tomographic and magnetic resonance evolution. *Radiology* 1985; 156: 111-115.

62. Oto A, Ernst R, Saade G. Magnetic resonance imaging of the chest, abdomen and pelvis in the evaluation of pregnant patients with neoplasms. *Am J Perinatol* 2007; 24: 243-250.

63. Goldsmith SJ, Kostakoglu L. Nuclear medicine imaging of lung cancer. *Radiol Clin North Am* 2000; 38: 511-524.

64. Bigot NR, Quint LE. Imaging of recurrent lung cancer. *Cancer Imaging* 2004; 4: 61-67.

65. Jeong YJ, Yi CA, Lee KS. Solitary pulmonary nodules: detection, characterization and guidance for further diagnostic workup and treatment. *AJR Am J Roentgenol*. 2007; 188: 57-68.

66. Shahan D, Guralnik I. The solitary pulmonary nodule: radiologic considerations. *Semin Ultrasound TC MR* 2001; 21: 97-115.

67. George PJM. Delays in the management of lung cancer. *Thorax* 1997; 52: 107-108.

68. Ikeda I. Two site radioimmunoassay (sandwich) assay of carcinoembryonic antigen using monoclonal antibodies. Kato H, Debruijn HW, Ebert W, Hebermann RB, Johnson JP.

Eds. Squamous cell carcinoma antigen in the management of bronchial carcinoma invading the chest wall. *Thorax* 1979; 612: 615.

69. Shoplaud DR, Eyne HJ, Pechacek TF: Smoking attributable cancer now the leading cause of death among smokers in the USA?. *J Nat Cancer Inst* 1991; 83: 1142-1148.

70. Buccheri GF, Ferrigno D: Usefulness of TPA in staging, monitoring and prognosis of lung cancer. *Chest* 1988; 93: 565-570.

71. Masaaki K, Terasaki PI, Chia D et al: Heterogeneous amplification of MYC family oncogenes in small cell lung carcinoma. *Cancer* 1990; 15: 2053-2058.

72. Payne PW, Sebo TJ, Doudkine A et al. Sputum screening by quantitative microscopy: area examination of a portion of the National Cancer Institute Cooperative Early Lung Cancer Study. *Mayo Clinic. Proc* 1997; 72: 697-699.

73. Somers V, Pietersen A, Theunissen P, Theunisen F. Detection of K-ras point mutation in sputum from patients with adenocarcinoma of the lung by point-exact. *J Clin Oncology* 1998; 42: 542.

74. Mao L, Hurban RH, Bayle JO, Tockman M, Sidrausky D. Detection of oncogene mutations in sputum precedes diagnosis of lung cancer. *Cancer Res* 1995; 54: 1634-1637.

75. Wallace MB, Pascual JM. Minimally invasive endoscopic staging of suspected lung cancer. *JAMA*. 2008; 299: 540-546.

76. Díaz-Jiménez JP, Sans Torres J, Domingo C, Martínez-Ballarín I, Castro MJ, Manresa F. Primer caso en España de detección de un carcinoma escamoso oculto mediante la utilización del sistema LIFE. *Med Clin (Barc)* 1998; 110: 217-219.

77. Gronowitz JS, Bergström R, Nous E et al: Clinical and serologic markers of stage and prognosis in small cell lung cancer. *Cancer* 1990; 66: 722-732.
78. Erasmus JJ, Sabloff BS. CT, Positron Emission Tomography, and MRI in Staging Lung Cancer. *Clin Chest Med* 2008; 29: 39-57.
79. Agüero R, Durán J, Pagola H. Papel de la Tomografía Computarizada de tórax en el estudio de extensión del carcinoma broncogénico. *Arch Broncol* 1990; 26: 65.
80. Fleckenstein JL. Maximum standard uptake values of mediastinal nodes on PET and CT. *Ann Thorac Surg* 2007; 84: 1797-1798.
81. Dwamena BA, Sonnad SS, Angobalde JO, Wahl RL. Metastasis from non-small cell lung cancer: mediastinal staging in the 1990s meta-analytic comparison of PET and TC. *Radiology* 1999; 213: 530-536.
82. Tateishi U, Maeda T, Morimoto T, Miyake M, Arai Y, Kim EE. Non-enhanced CT versus contrast-enhanced CT in integrated PET/CT studies for nodal staging of rectal cancer. *Eur J Med Mol Imaging* 2007; 34: 1627-1634.
83. Marom EM, McAdams HP, Erasmus JJ., Goodman PC, Culhane JJ, Coleman DK. Staging non-small cell lung cancer with whole-body PET. *Radiology* 1999; 212: 803-809.
84. Altamirano- Ley J. Positron emission tomography and computed tomography (PET/CT) in lung cancer. *Cir Cir.* 2007; 75: 303-311.
85. Bury T, Corhay F, Ghaye B, Barthelemy N. Value of FDG-PET in detection residual of recurrent nonsmall cell lung cancer. *Eur Resp J* 1999; 14: 1376-1380.
86. Scanagatta P, Banodiman C. Mediastinoscopy for diagnosis of diseases of the chest and tagging of lung cancer: our experience in 253 cases. *Chir Ital.* 2005; 57: 177-182.

87. Burt MF, Pomerantz AH, Bains MS. Results of surgical treatment of stage II lung cancer invading the mediastinum. *Surg Clinic of NA* 1987; 67: 987-1001.

88. Ginsberg RJ, Rice TW, Goldberg M, Waters PF, Schomocker BJ. Extended cervical mediastinoscopy. A single staging procedure for bronchogenic carcinoma of the left upper lobe. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 94: 673-678.

89. Howington JA. The role of VATS for staging and diagnosis in patients with non-small cell lung cancer. *Semin Thorac Cardiovasc Surg*. 2007; 19: 212-6.

90. Maimonis P, Mayes DF, Schaffels Y, Kufe D. Lung cancer associated protein: development and characterization of a new assay that detects a circulating lung cancer marker. *Cancer Res* 1991; 51: 3838-3842.

91. Harding M, McAllister J, Hules G. Neurone specific enolase in small cell lung cancer: a tumor marker of prognostic significance?. *Br J Cancer* 1990; 61: 605-610.

92. Muñoz A, López-Vivanco G. Metastatic non-small cell lung carcinoma successfully treated with pre-operative chemotherapy and bilateral adrenalectomy. *Jpn J Clin Oncol*. 2006; 36: 731-4.

93. Mercier O, Fadel E, de Perrot M, Mussot S, Stella F, Chapelier A, Darteville P. Surgical treatment of solitary adrenal metastasis from non-small cell lung cancer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 130: 136-140.

94. Concannon JP, Dalbow MH, Lieber GA. The carcinoembryonic antigen assay in bronchogenic carcinoma. *Cancer* 1974; 34: 184-188.

95. Paus E, Nustad K. Immunoradiometric assay for alpha-gamma and gamma-gamma enolase (NSE) with use of monoclonal antibodies and magnetizable polymer particles. *Clin Chem* 1989; 35: 2034-2038.

96. Mountain CF, Libshitz HI, Hermes KE. Lung cancer. A handbook for staging, imaging and lymph node classification. Houston: Charles P. Young Company. 1999.

97. Naruke T, Suemasu K, Ishikawa S. Lymph node mapping and curability at various levels of metastasis in resectal lung cancer. J Thorac Cardiovasc Surg 1987; 76: 832-839.

98. The Japan Lung Cancer Society. Classification of lung Cancer, 1st English Ed. Tokyo: Kanehara & Co., 2000.

99. Mountain CF, Dresler CM. Regional lymph node classification for lung cancer staging. Chest 1997; 111: 1718-1723.

100. Zell JA, Ignatius Ou SH, Ziogas A, Anton-Culner H. Validation of the proposed International Association for the Study of Lung Cancer non-small cell lung cancer staging system revisious for advanced bronchioloalveolar carcinoma using data from the California Cancer Registry. J Thoracic Oncol. 2007; 2: 1078-1085.

101. Sheperd FA, Crowley J. International Association for the Study of Lung Cancer International Staging Committee and Participating Institutions. The International Association for the study of Lung Cancer staging project proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer. J Thorac Oncol. 2007; 2: 1067-1077.

102. Sobin LH, Wittekind Ch. Editors TNM classification of malignant tumors. 5th ed. Union Internationale Contre le Cancer and the American Joint Committee on Cancer. Cancer 1997; 80 :1803-1804.

103. Churchill ED. The surgical treatment of carcinoma of the lung. J Thorac Surg 1933; 2: 254-261.

104. Wada H, Nakamura T, Nakamoto K, Maeda M, Watanabe Y. Thirty-day operative mortality for thoracotomy in lung cáncer. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115: 70-73.
105. Rossel R, Gómez-Codina J, Camps C, Maestre J, Padilla J, Cantó A. A randomized trial comparing preoperative chemotherapy plus surgery with surgery alone in patients with non-small cell lung cancer. *N Engl J Med* 1994; 330: 153-158.
106. Ferray D, Mirkovic N, Albain KS. Multimodality therapy for stage III non-small cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3257-3269.
107. Betticher D, Depierre A. Pre-operative chemotherapy in non small cell lung cancer. *Rev Mal Resp* 2005; 22: 112-117.
108. Saito H, Takada Y, Ichinose Y, Eguchi K, Kudoh S, Matsui K, Nakagawa K, Takada M, Negoro S, Tamura K, Ando M, Tada T, Fukuoka M; West Japan Thoracic Oncology Group 9902. Phase II study of etoposide and cisplatin with concurrent twice-daily thoracic radiotherapy followed by irinotecan and cisplatin in patients with limited-disease small-cell lung cancer: West Japan Thoracic Oncology Group 9902. *J Clin oncol* 2006; 24: 5247-5252.
109. Curran WK, Scott C, Langer R et al. Long-term benefit is observed in a phase III comparison of sequential vs concurrent chemo-radiation for patients with unresected stage III NSCLC: RTOG 99410. *Proc Am Soc Clin Oncol* 2003; 22: 621.
110. Bernard A, Ferrand L, Hagry O, Benoit L, Cheynel N, Faure JL. Identification of prognostic factors determining risk groups for lung resection. *Ann Thorac Surg* 2000; 70:1161-1167.
111. Werner-Walsik M, Scott C, Cox JD, Sause WT, Byhardt RW, Asbell S et al. Recursive partitioning analysis of 1999 radiation therapy oncology group (RTOG)

patients with locally advanced non small-cell lung cancer (LA-NSCLC): Identification of five groups with different survival. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48: 1475-1482.

112. Jett JR, Scott WJ, Rivera MP, Sause WT. American College of Chest Physicians. Guidelines on treatment of stage IIIB non-small cell lung cancer. *Chest* 2003; 123 (1 Suppl): 221S-225S.

113. Pao W, Miller VA. Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors and non-small cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol* 2005; 23: 2556-2568.

114. Asamara H, Goya T. A Japanese Lung Cancer Registry Study: prognosis of 13010 resected lung cancer. *J Thorac Oncol* 2008; 3: 46-52.

115. Gutman EB, Sproul EE, Gutman AB. Significance of increased phosphatase activity of bone at the site of osteoblastic metastases secondary to carcinoma to the prostate gland. *Am J Cancer* 1936; 28: 485-487.

116. Zondek B. The importance of increased production and excretion of gonadotrophic hormona for diagnosis of hydatiform male. *J Obst Gynecol Br Emp* 1942; 49: 307-309.

117. Gold P, Freedman SO. Demonstration of tumor specific antigens in human colonic carcinomata by immunologic tolerance and absorption techniques. *J Exp Med* 1965; 121: 439-441.

118. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 494-497.

119. Abelov GL.: Alpha-fetoprotein in oncogenesis and its association with malignant tumors. *Adv Cancer Res*: 1971; 14: 295-358.

120. Willhauck MJ. Alpha-fetoprotein promoter-targeted sodium ioide symporter gene therapy of hepatocellular carcinoma. *Gene Ther.* 2008; 15: 214-223.
121. Zancheck N: The present status of CEA in diagnosis, prognosis and evaluation of therapy. *Cancer* 1975; 36: 2460-2468.
122. Nutini S, Capelli G, Benucci A, Catalani C, Nozoli F. Serum NSE, CEA, CT, Ca 12.5 levels in human lung cancer. *Int J Biol Markers* 1990; 5: 198-202.
123. Schneider J. Tumor markers in detection of lung cancer. *Adv Clin Chem* 2006; 42: 1-41.
124. Okamoto T, Nakamura T, Ikeda J, Maruyama R, Shaji F, Miyate T, Wataya H, Ichinoso Y. Serum carcinoembryonic antigen as a predictive marker for sensitivity to gefitinib in advance non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1286-1290.
125. Muley T, Fetz TH. Tumor volume and tumor marker index based on CYFRA 21-1 and CEA are strong prognostic factors in operated early stage NSCLC. *Lung Cancer J* 2007; 30: 1227-1230.
126. Gaspar. Value of CEA and Ca 125 regarding relapse and metastasis in respectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 3427-3432.
127. Wu GP, Ba J, Zhao YJ, Wang EH. Diagnostic value of CEA, CYFRA 21-1, NSE and Ca 12.5 assay in serum and pleural effusion of patients with lung cancer. *Acta Cytol.* 2007; 51: 679-680.
128. Díez M, Cerdán FJ, Ortega M, Balibrea JL: Utilización de marcadores tumorales en el cáncer de pulmón. Estudio comparativo entre CEA, CA 12.5, Ferritina., Beta HCG y Beta-2-microglobulina. *Cirugía Española* 1989; 46: 337-342.

129. Romero S, Martín C, Senet C. Utilidad clínica de la determinación plasmática del antígeno carcinoembrionario en el diagnóstico del carcinoma bronquial. *Med Clin* 1987; 88: 529-533.

130. Sugio K, Sugayo M, Hanagiri T, Yasumoto K. Tumor marker in primary lung cancer. *J VOEH* 2004 1; 26: 473-479.

131. Hsu WH, Huang CS, Hsu HS, Huang WJ, Lee HC, Huang BS, Huang MH. Preoperative serum carcinoembryonic antigen level is a prognostic factor in women with early non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2007; 83: 419-424.

132. Okamoto T, Nakamura T, Ikeda J, Maruyama R, Shaji F, Miate T, Wataya H, Ichinose Y. Serum carcinoembryonic antigen as a predictive marker for sensitivity to gefitinib in advanced non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer* 2005; 41: 1286-1290.

133. Sakao Y, Tomimitsu S, Takeda Y, Natsuaki M, Itoh T. Carcinoembryonic antigen as a predictive factor for postoperative tumor relapse in early-stage lung adenocarcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 2004; 25: 520-522.

134. Asseo PP, Tracopoulos GD. Phosphohexose isomerase on lung cancer. *Clin Chem* 1988; 34: 649-650.

135. Santabárbara P, Molina R, Estapé J, Ballesto AM. Phosphohexose isomerase and carcinoembryonic antigen in the serum of patients with primary lung cancer. *Int J Biol Mark* 1988; 3: 113-122.

136. Gom SA, Keevil BG, Thatcher N, Hasleton PS, Swindell RS: The value of tumor marker in lung cancer. *Br J Cancer* 1988; 56: 797-804.

137. Shimizu A, Suxuki F, Kato K: Characterization of oo,bb,gg and Og human enolase isoenzymes and preparation of hybrid enolases (Oy, bg, Ob) from hemodimeric forma. *Biochem Biopsy Acta* 1983; 748: 278-284.

138. Kato K, Ishiguro Y, Ariyosi Y. Enolase isoenzymes as disease markers: distribution of the three enolase subunits (alfa, beta and gamma) in various human tissues. *Disease Markers* 1983; 1: 213-220.
139. Paus E and Nutstad K. Immunoradiometric assay for alphagamma and gammagamma enolase (NSE) with use of monoclonal antibodies and magnetizable polymer particles. *Clin Chem* 1989; 35: 2034-2038.
140. Harding M, McAllister J, Hulks G, Vernon D, Monie R, Paul J, Kaye SB. Neurone specific enolase in small cell lung cancer: a tumor marker of prognostic significance?. *Br J Cancer* 1990; 61: 605-610.
141. Serhaus S, Steinshamn S. Expression of neuroendocrine markers in non-small cell lung cancer. *APMIS*. 2007; 115: 152-163.
142. Naoko M, Atsushi H, Hammato K: Availability of tumor-antigen 4 as a marker of squamous cell carcinoma (SCC) of the lung and other organs. *Cancer* 1988; 62: 730-734.
143. Kato H, Torigoe T: Radioimmunoassay for tumor antigen of human cervical squamous cell carcinoma. *Cancer* 1977; 41: 1621-1628.
144. Ueda G, Inove I, Yamasaki M et al: Immunohistochemical demonstration of tumor antigen TA4 in gynecologic tumors. *Int J Gynecol Pathol* 1984; 3: 291-296.
145. Molina R, Filella X. Tumor markers (CEA, Ca 125, CYFRA 21-1, SCC and NSE) in patients with non-small cell lung cancer as an aid in histological diagnosis and prognosis. Comparison with the main clinical and pathological prognostic factors. *Tumor Biol* 2003; 24: 209-218.
146. Body JJ, Sculier JP, Raymarkers N et al: Evaluation of squamous cell carcinoma antigen as a new marker for lung cancer. *Cancer* 1990; 65: 1552-1556.

147. Buyru N, Tigli H, Duranyildiz D, Dalay N. Molecular detection of squamous cell carcinoma antigen transcripts in peripheral blood of cancer patients. *Clin Chem Lab Med.* 2006; 44: 538-41.
148. Buccheri GF, Ferrigno D, Sartoris AM et al: Tumor markers in bronchogenic carcinoma. *Cancer* 1987; 60: 42-50.
149. Buccheri G, Ferrigno D. Lung tumour marker in oncology practice: a study of TPA and Ca 125. *Br J Cancer* 2002; 87: 1112-1128.
150. Rasmunson T, Björk GR, Damber L. Tumor marker s in bronchogenic carcinoma. *At Radiol Oncol* 1983; 22: 209-214.
151. Ratto GB, Capponi G, De Grandi R, Augeri C, Secco GB, Fardelli R. Tumor markers I: Their significance in the preoperative assesment of lung neoplasm. *Minerva Chir* 1990; 45: 1265-1272.
152. Bast RC, Fenny M, Lzarus H. Reactivity of a monoclonal antibody with humans ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981; 68: 1331-1337.
153. Rustin G, Gennings J, Nelstrop A, Covarribas H, Lambert HE, Bagshawe KD. Use of CA 12.5 to predict survival of patients with ovarian carcinoma. *J Clin Oncol* 1989; 7: 1667-1670.
154. Díez M, Torres A, Maestro ML, Ortega MD, Gómez A, Polllán M, López JA, Picardo A, Hernando F, Balibrea JL. Prediction of survival and recurrence by serum and cytosolic levels of CEA, CA 12.5 and SCC antigens in resectable non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1996; 73: 1248-1254.
155. Collazos J, Genold, Allende MT, Tribal A. Serum Ca 125 levels inpatients with non-malignant liver siseases without ascitis. *Clin Investig* 1993, 71: 239-242.

156. Zhu W, Michael CW. WT1, monoclonal CEA, TTF1 and CA 125 antibodies in the differential diagnosis of lung, breast and ovarian adenocarcinomas in serous effusions. *Diagn Cytopathol* 2007; 35: 370-375.
157. Touiton Y, Boydan A, Dautzenberg B. Specificity of tumor marker antigen in benign respiratory diseases. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1337-1339.
158. Bates SE. Clinical applications of serum tumor markers. *Ann Internl Medicine* 1991; 15: 623-640.
159. Kimura Y, Fujii T, Hamamoto K, Iio A. Serum Ca 125 levels is a good prognostic indicator in lung cancer. *Br J Cancer* 1990; 62: 676-678.
160. Díez M, Torres, Ortega MD, Maestro ML, Gómez A, Balibrea JL. CEA, CA 50, CA 125 and SCC in non-small cell lung cancer tissue. *J Tumor Marker Oncol* 1991; 6: 89-92.
161. Ruibal A, Nuñez MI, Rodríguez J, Jiménez L, del Río MC, Zapatero J. Cytosolic levels of neuron-specific enolase in squamous cell carcinomas of the lung. *Int J Biol Markers* 2003; 18: 188-194.
162. Gaspar MJ, Díez M, Rodríguez A, Ratia T, Martín Duce A, Galván M, Granell J, Coca C. Clinical value of CEA and CA 125 regarding relapse and metastasis in respectable non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 3427-2432.
163. Trape J, Buxo J, Pérez de Olaguer J, Vidal C. Tumor markers as prognostic factors in treated non small-cell lung cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 4277-4281.
164. Chiu CH, Shih YN. Serum tumor markers as predictors for survival in advanced non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Lung Cancer* 2007; 7: 213-221.

165. Sugio K, Satoh. Tumor marker in primary lung cancer. *J UOEH* 2004; 26: 473-479.
166. Kodame T, Satoh H. Serum levels of CA 19-9 in patients with non-malignant respiratory diseases. *J Clin Lab Anal* 2007; 21: 103-6.
167. North WG, Ware J, Mauner LH, Chahinian AP, Perry M: Neurophysins as tumor markers for small cell carcinoma of the lung. A cancer and leukaemia group B evaluation. *Cancer* 1988; 62: 1343-1347.
168. Cuberes R, Suárez A, Torres A. Enzima convertidora de angiotensina en el cáncer de pulmón. *Cir Esp* 1990; 47: 141-144.
169. Yildirim A, Meral M. Relationship between serum levels of some acute-phase proteins and stage of diseases and performance status in patients with lung cancer. *Med Sci Monit* 2007; 13: 195-200.
170. Mulshine JL and Ruckdeschel JC: The role of chemotherapy in the management of dissemination non-small cell lung cancer. En: Roth JA (eds). *Thoracic Oncology* 1989; 229-229.
171. Farante G and Chacin R.: Utilidad de los marcadores tumorales en oncología. En: Veronesi U (ed). *Avances en oncología (ESO)*. Milán 1990: 49-63.
172. Esme H, Cemek M. High levels of oxidative stress in patients with advanced lung cancer. *Respirology* 2008; 13: 112-6.
173. Mahabir S, Forman MR, Barerra SL, Dong YQ, Spitz MR, Wei Q. Joint effects of dietary trace metals and DNA repair capacity in lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16: 2756-62.
174. Rous P. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J Exper Med* 1911; 13: 397-411.

175. Martin GS. Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. *Nature* 1970; 227: 1021-1023.
176. Hernández Hernández JR. Genética y cancer de pulmón. En: Caminero Luna JA, Fernández Fay L (ed). *Actualizaciones SEPAR*. Barcelona, Filadelfia: Proas Science; 1996; 71-96.
177. Schwartz AG, Ruckdeschel JC. Familial lung cancer: genetic susceptibility and relationship to chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173: 16-22.
178. Adonis M, Martínez V, Marín P, Berrios D, Gil L. Smoking habit and genetic factors associated with lung cáncer in a population highly exponed to arsenic. *Toxicol Lett* 2005; 159; 32-37.
179. Kumar R, Sukumar S, Barbacid M. Acativation of RAS oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science* 1990; 248: 1011-1014.
180. Ewis AA et al. Occupational cancer genetics: infrequent ras oncogenes point mutations in lung cancer samples from chromate workers. *Am J Ind Med* 2001; 40: 92-97.
181. Marchetti A, Pellegrini S, Sozzi G, Bartacea G, Galta P, Buttitta F, Carnicelli V, Griseri P, Chella A, Angeletti CA, Pierotti M, Bevilacqua G. Genetic analysis of ling tumors of non-smoking subjects: p53 gene mutations are constant associated with lass of heterozygosity at the FHTT locus. *Br J Cancer* 1998; 78: 73-78.
182. Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 689-698.

183. Fong KM, Sekido Y, Gazdar AF, Minna JD. Lung cancer. 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Thorax* 2003; 58: 892-900.

184. You XL, Yen L, Zeng-Roug N, Al Moustafa AE, Alaoni-Jamali MA. Dual effect of Erb-2 depletion on the regulation of DNA repair and cell lung cancer. *Oncogene* 1998; 17: 3177-3186.

185. Nakamura H, Takamori S, Fujii T, Ono M, Yamana M, Shirouzu K. Cooperative cell-growth inhibition by combination treatment with ZD1839 (Iresa) and trastuzumab (Herceptin) in non-small cell lung cancer. *Cancer Lett* 2005; 230: 33-46.

186. Tateishi M, Ishide T, Mitsudomi T, Taneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-Erb-2 protein expression in human lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1372-1375.

187. Díez M, Pollán M, Maestro M, Torres A, Hernando F, Balibrea JL. Prediction of recurrence by quantification of p185 neu protein in non-small cell lung cancer tissue. *Br J Cancer* 1997; 75: 684-689.

188. Konkourakis MI, Giatromanolaki A, O'Bryne KJ, Cox J, Krammer B, Gatter KC, Harris AL. Bcl-2 and c-Erb-2 proteins are involved in the regulation of VEGF and of thymidine phosphorylase angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17: 545-554.

189. Harpole DHJr, Herndon JE, Wolfe WG, Iglehart JD, Marks JR. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology and oncoprotein expression. *Cancer Res* 1995; 55: 51-56.

190. Kim YC, Park KO, Kern JA, Park CS, Lim SC, Jang AS, Young JB. The interactive effect of ras, Erb 2, p53 and Bcl-2 expression in predicting the survival of non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer* 1998; 22: 181-190.

191. D'Amico TA, Massey M, Rendón JE, Moore MB, Harpole DH Jr. A biologic risk model for stage I lung cancer: immunohistochemical analysis of 408 patients with the use ten molecular markers. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999; 117: 736-743.

192. Tsai CM, Chang KT, Wu LH, Chen YJ, Gazdar AF, Mitsudoni T, Chen MH, Perng RP. Correlations between intrinsic chemoresistance and HER-2/neu gene expression, p53 gene mutations and cell proliferation characteristics in non-small cell lung carcinoma. *Cancer res* 1996; 56: 206-209.

193. Cantero R, Torres AJ, Maestro M, Fernández C, Hernando F, del Barco V, Sanz T, Balibrea JL. Use of possible synergistic expression of p53 and p185 as a prognostic tool for stage I non-small-cell lung cancer. *World J Surg.* 1999; 23: 1294-1299.

194. Hirsch FR, Varella-García M, Franklin WA, Veve R, Chen L, Helfrich B, Zeng C, Baron A, Bunn PA Jr. Evaluation of HER-2/neu gene amplification and protein expression in non-small cell lung carcinoma. *Br J Cancer* 2002; 86:1449-1456.

195. Pfeiffer P, Clausen PP, Andersen K, Rose C. Lack of prognostic significance of epidermal growth factor receptor and the oncoprotein p185 HER-2 in patients with systemically untreated non-small cell lung cancer: an immunohistochemical study on cryosections. *Br J Cancer* 1996; 74: 86-91.

196. Mackinnon M, Kery KM, King G, Kennedy MM, Cockburn JC, Jeffrey RR. P53, c-erb-2, and nm23 expression have no prognostic significance in primary pulmonary adenocarcinoma. *Eur J Cardiothorac Surg* 1997; 11: 838-842.

197. Kwiatkowski DJ, Harpole DH Jr, Godleski J, Herndon JE, Shieh DB, Richards W, Blanco R, Xu HJ, Strauss GM, Sugarbaker DJ. Molecular Pathologic

substaging in 244 stage I non-small cell lung cancer patients: clinical implications. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2468-2477.

198. Pastorino U, Andreola S, Tagliabue E, Pezzela F, Incarbone M, Sozzi G, Buyse M, Menard S, Pierotti M, Rilke F. Immunocytochemical markers in stage I lung cancer: relevance to prognosis. *J Clin Oncol* 1997; 15: 2858-2865.

199. Moldvay J, Scheid P, Wild P, Nabil K, Siat J, Borrelly J, Marie B, Farre G, Labit T, Pottier G, Sesbone R, Bronner C et al. Predictive lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 6: 1125-1134.

200. Merrick DT, Kittelson J, Winterhalder R, Kotantoulas G, Ingeberg S, Keith RL, Kennedy TC, Miller YE, Franklin WA, Hirsch FR. Analysis of c-ErbB1/ epidermal growth factor receptor and c-ErbB2/HER-2 expression in bronchial dysplasia: evaluation of potencial targets for chemoprevention of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006 1; 12: 2281-2288.

201. Shi D, He G, Cao S et al. Overexpression of the c-erbB-2/ neu-encoded p185 protein in primary lung cancer. *Mol Carcinog* 1992; 5: 213-218.

202. Kern JA, Schwartz DA, Nordberg JE. P185 neu expression in human lung adenocarcinomas predicts shortened survival. *Cancer Res* 1990; 50: 5184-5191.

203. Tateishi M, Ishida T, Mitsudomi T, Kaneko S, Sugimachi K. Prognostic value of c-erbB-2 protein expresión in human lung adenocarcinomas and squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 1991; 27: 1372-1375.

204. Fijolek J, Wiatr E, Rowinska-Zakrzewska E, Giedronowicz D, Langfort R, Chabowski M, Orlowski T, Roszkowski K. P53 and Her2/neu expression in relation to chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer. *Int J Biol Markers* 2006; 21: 81-87.

205. Merrick DT, Kittelson J, Winterhalder R, Kotantoulas G, Ingeberg S, Keith RL, Kennedy TC, Miller YE, Franklin WA, Hirsch FR. Analysis of c-ErbB1/epidermal growth factor receptor and c-ErbB2/HER-2 expression in bronchial dysplasia: evaluation of potential targets for chemoprevention of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 2281-2282.
206. Zhu Y, Harrison DJ, Blader SA. Genetic and epigenetic analysis of MBD3 in colon and lung cancer. *Br J Cancer* 2004; 90: 1972-1975.
207. Pezzella F, Turley H, Kuzu I, Tuugekar MF, Dunhill MS, Pierce CB, Harris A, Gatter KC, Mason DY. Bcl-2 protein in non small cell lung cancer. *N Engl J Med* 1993, 329: 690-694.
208. Rudin CM, Salgia R, Wang X. Randomized phase II Study of carboplatin and etoposide with or without the bcl-2 antisense oligonucleotide oblimersen for extensive-stage small-cell lung cancer: CALGB 30103. *J Clin Oncol* 2008; 26: 870-876.
209. Sinues B, Fanlo A, Bernal ML, Mayayo E, Bello S, Rubio E, Isla D. MDR-1 C3435 genetic polymorphism and tobacco-related lung cancer. *Oncology* 2003; 64: 183-185.
210. Marcy TW, Stefanek M, Thompson KM. Genetic testing for lung cancer risk: if physicians can do it, should they? *J Gen Intern Med* 2002; 17: 946-951.
211. Raben D, Helfrich B, Bunn PA, Jr. Targeted therapies for non-small-cell lung cancer: biology, rationale and preclinical results from a radiation oncology perspective. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 59: 27-38.
212. Boveri T. Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren. *Science* 1912; 36: 453-468.

213. Harris H, Miller OJ, Klein G, Warst P, Tachibano T. Supression of malignancy by cell fussion. *Nature* 1969; 223: 363-368.
214. Weissman BE, Saxon PJ, Pasquale SR, Jones GR, Geiser AG Stanbridge EJ. Introduction of a normal human chromosome 11 into a Wilms'tumor cell line controls its tumorigenic expression. *Science* 1987; 236: 175-180.
215. Shimizu E, Coxon A, Otterson G, Steinberg SM, Kratzke RA, Kim YW Fedorko J, Oie H, Johnson BE, Mulshine JL. RB protein status and clinical correlation from 171 cell lines representating lung cancer, extrapulmonary small cell lung carcinoma and mesothelioma. *Oncogene* 1994; 9: 2441-2448.
216. Reissmann PT, Koga H, Takahashi R, Figlin RA, Holmes EC, Piantadosi S, Cardon-Cardo C, Slamon DJ. Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in non-small cell lung cancer. The Lung Cancer Study Group *Oncogene* 1993; 8: 1913-1919.
217. Cagle PT, El-Naggar AK, Yu H-J, Hu S-X, Benedict WF. Differential retinoblastoma protein expression in neuroendocrine tumors of the lung: potential diagnostic implications. *Am J Pathol* 1997; 150: 393-400.
218. Ross JA, Rosen GD. The molecular biology of lung cancer. *Curr Opin Pulm Med* 2002; 8: 265-269.
219. Osada H, Takahashi T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene* 2002; 21: 7421-7434.
220. Sanders BM, Jay M, Draper GJ, Roberts EM. Non ocular cancer in relatives of retinoblastoma patients. *Br J Cancer* 1989; 60: 358-365.

221. Ookawa K, Shiscki M, Takahashi R, Yoshida Y, Teruda M, Yokota J. Reconstruction of the RB gene suppresses the growth of small-cell lung carcinoma cells carrying multiple genetic alterations. *Oncogene* 1993; 8: 2175-2181.
222. Nuñez L, Escuín A, Barnados A. P53: gen supresor de tumores. En: Rosell R, Abad, Monzó M, Barnados A (ed). *Manual de Oncología Clínica y Molecular*. Madrid. Arán 2000; 109-117.
223. D'Amico D, Carbone D, Mitsudomi T, Nan M, Federko I, Russell E, Jonson B, Buchhagen D, Bodner S, Phelps R. High frequency of somatically acquired p53 mutations in small-cell lung cancer lines and tumors. *Oncogene* 1992; 7: 339-346.
224. Das F, Bolufer P. Marcadores tumorales y oncogenes en el cáncer de pulmón. *Oncología* 1993; 16: 443-452.
225. Hall PA, Mek D, Lane DP. P53-integration the complexity. *J Pathol* 1996; 88: 323-331.
226. Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997; 88: 323-331.
227. Hall PA, McKee PH, Menage HDP, Lane DP. High levels of p53 protein in UV-irradiated normal human skin. *Oncogene* 1993; 8: 203-207.
228. Steel R, Thompson A, Hall P, Lane D. The p53 tumor suppressor gene. *Br J Surg* 1998; 85: 1469-1467.
229. Sekido Y, Fong K, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochimica et Biohysica Acta* 1998; 1378: 21-59.
230. Sekido Y, Fong K, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Ann Rev Med* 2003; 54: 73-87.

231. Sattler M, Salgia R. Molecular and cellular biology of small cell lung cancer. *Semin Oncol* 2003; 30: 57-71.
232. Houfek JF, Arwood JR. Genetic susceptibility to lung cancer: implications for smoking cessation. *Medsurg Nurs* 2003; 12: 45-49.
233. Ma LL, Sun WJ, Wang ZH, ZH GY, Li P, Fu SB. Effects of silencing of mutant p53 gene in human lung adenocarcinoma cell line Anio973. *J Exp Clin Cancer Res* 2006; 25: 585-592.
234. Mitsudomi T, Hamajima N, Ogawa M, Takahashi T. Prognostic significance of p53 alterations in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 4055-4063.
235. Gebitekin C, Bayram AS, Tunca B, Balaban SA. Clinical Significance of p53 Gene Mutation in T1-2 N0 Non-Small Cell Lung Cancer. *Asian Cardiovasc Thorac Ann* 2007; 15: 35-38.
236. Buccheri G, Ferrigno D. Prognostic value of stage grouping and TNM descriptors in lung cancer. *Chest* 2000; 117: 1247-1255.
237. Tsubochi H, Sato N, Hiyama M, Kaimori M, Endo S, Sohara Y, Imai T. Combined analysis of cyclooxygenase-2 expression with p53 and Ki-67 in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 2006; 82: 1198-1204.
238. Horio Y, Takashashi T, Kuroisi T. Prognostic significance of p53 mutations and chromosome 3p deletions in primary resects non small cell lung cancer. *Cancer Res* 1993; 53: 14.
239. Ahrendt SA, Hu Y, Buta M, McDermott MP, Benoit N, Yang SC, Wu L, Sidransky D. P53 mutations and survival in stage I non-small-cell lung cancer: results of a prospective study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 961-70.

240. Shimmyo T et al. Etiologic value of p53 mutation spectro and differences with histology in lung cancers. *Cancer Sci.* 2008; 26: 870-876.
241. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 turn our suppressor gene. *Nature* 1991; 351: 453-456.
242. Henschke CI, Yankelevitz DF. CT screening for lung cancer. *Radiol Clin North Am* 2000; 38: 487-495.
243. Lee Y, Wu CT, Kuo SW, Tseng YT, Chang YL. Significance of extranodal extension of regional lymph nodes in surgically resected non-small cell lung cancer. *Chest* 2007; 131: 993-999.
244. Kohno H, Hiroshima K, Toyazaki T, Fujisama T, Ohwada H. P53 mutation and allelic loss of chromosome 3p, gp of preneoplastic lesions in patients with non-small cell lung carcinoma. *Cancer* 1999; 85: 341-7.
245. Higashiyama M, Doi O, Yojouchi H. Immunohistochemical analysis of nm-23 product / NDP kinase expression in pulmonary adenocarcinoma: lack of prognostic value. *Br J Cancer* 1992; 66: 533-536.
246. Roland M, Rudd RM. Somatic mutations in the development of lung cancer. *Thorax* 1998; 53: 979-983.
247. Kunkel TA. Slippery DNA and diseases. *Nature* 1993; 365: 207-208.
248. Peinado MA, Malkosyan S, Velázquez A, Perucho M. Isolation and characterization gains in colorectal tumors by arbitrary primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10065-10069.
249. Ninomiya H, Nomura K, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Fujiwara M, Tsuchiya E, Ishikawa Y. Genetic instability in lung cancer: concurrent analysis of

chromosomal, mini- and microsatellite instability and loss of heterozygosity. *Br J Cancer*. 2006; 94: 1485-91.

250. Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, Sakaguchi AY. Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature* 1987; 329: 451-454.

251. Leduc D. Loss of heterozygosity in a gene coding for a thyroid hormone receptor in lung cancers. *Am J Hum genet* 1989; 44: 282-287.

252. Sekido Y, Fong KM, Minna FD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochem Biophys Acta* 1998; 1378: 21-59.

253. Ashton –Rickardt PG, Wyllie AH, Bird CC, Dunlop MG, Steel CM, Morris RG et al. MCC, a candidate familial polyposis gene in 5q.21, shows frequent allele loss in colorectal and lung cancer. *Oncogene* 1991; 6: 1881-1886.

254. Takeuchi T, Minami Y, Iijima T, Kameya T, Asamura H, Noguchi M. Characteristic of loss of heterozygosity in large cell neuroendocrine carcinomas of the lung and small cell lung carcinomas. *Pathol Int*. 2006; 56: 434-439.

255. Lin X, Gu J, Lu C, Spitz MR, Wu X. Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5720-5.

256. Perera SA, Maser RS, Xia H, McNamara K, Protopopov A, Chen L, Hezel AF, Kim CF, Bronson RT, Castrillon DH, Chin L, Bardeesy N, Depinho RA, Wong KK. Telomere dysfunction promotes genome instability and metastatic potential in a K-ras p53 mouse model of lung cancer. *Carcinogenesis* 2008; 29: 747-53.

257. Ando S, Kimura H, Iwai N, Shima M, Ando M, Kuriyama T. Optimal combination of seven tumor markers in prediction of advanced stage at first

examination of patients with non-small-cell lung cancer. *Anticancer Res* 2001; 21: 3085-3092.

258. Pollán M, Varela G, Torres A, de la Torre M, Ludeña MD, Ortega MD, Pac J, Freixenet J, Gómez G, Sebastián F, Díez M, Arrabal R, Canalís E, García-Tirado J, Arnedillo A, Rivas JJ, Minguella J, Gómez A, García M, Aragonés N, Pérez-Gómez B, López-Abente G, González-Sarmiento R, Rojas JM. Clinical value of p53, c-erbB-2, CEA and CA 12.5 regarding relapse, metastasis and death in respectable non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 2003; 107: 781-790.

259. Lindahl T, Norberg T, Aström G, Sjögren S, Bergh CJ. Cellular and tissue markers in solid tumors. In: Bronchud MH, Foote MA, Peters WP, Robinson MO (eds). *Principles of molecular oncology*. Totowa, NJ. Humana Press 2000; 95-110.

260. Mulligan CR, Meram AD, Proctor CD, Wu H, Zhu K, Marrogi AJ, Lung cancer staging: a cases for a new T definition. *Ann Thorac Surg* 2006; 82: 220-226.

261. Asamura H, Goya T, Koshiishi Y, Sohara Y, Tsuchiya R, Miyaoka E; Japanese Joint Committee of Lung Cancer Registry. How should the TNM staging system for lung cancer be revised? A simulation based on the Japanese Lung Cancer Registry populations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 132: 316-319.